

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**PAPEL DE P38-MAPK EN EL PROCESO DE APOPTOSIS
INDUCIDO POR CISPLATINO EN CÉLULAS
EPITELIALES DE TÚBULO RENAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Elena Rodríguez García

Bajo la dirección de la Doctora
Felicísima Mata Andrés

Madrid, 2009

• **ISBN: 978-84-692-1101-4** **© María Elena Rodríguez García, 2008**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**PAPEL DE p38-MAPK EN EL PROCESO DE APOPTOSIS
INDUCIDO POR CISPLATINO EN CÉLULAS EPITELIALES DE
TÚBULO RENAL**

MARÍA ELENA RODRÍGUEZ GARCÍA

2008



DRA. FELICÍSIMA MATA ANDRÉS. Profesora titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA

Que D^a. M^a Elena Rodríguez García, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo correspondiente a su Tesis Doctoral, titulado “PAPEL DE p38-MAPK EN EL PROCESO DE APOPTOSIS INDUCIDO POR CISPLATINO EN CÉLULAS EPITELIALES DE TÚBULO RENAL” y que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación.

LA DIRECTORA Y TUTORA

Fdo. Dra. Felicísima Mata Andrés

A mis padres

Leer esto significa que la tesis por fin “ha terminado”, y este es el momento de agradecer a todas las personas que han participado activamente en la elaboración de esta tesis doctoral. Son muchas las personas que a lo largo de estos años de Doctorado han estado a mi lado animándome y dándome ilusiones para poder terminarla, y espero poder reflejar a toda esa gente mi más sincero agradecimiento por todo ello, ya que además, esta es una de las partes (por no decir la única) que todos tus amigos leen y confío que todos tengáis un hueco aquí.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a Feli por la oportunidad que me brindó al ofrecerme la posibilidad de realizar esta Tesis doctoral en su laboratorio. Del mismo modo, quisiera agradecer la ayuda de todos los miembros del laboratorio de Patricio Aller, comenzando por él, poniendo a mi disposición toda su experiencia y todos sus recursos. Y continuando por los componentes de su equipo: Elena, Carlos, Donna, Adrián, Patricia... que me han ayudado en lo que han podido.

En segundo lugar, me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas con las que he compartido estos años en la UCM. Quisiera agradecer a todos los integrantes del grupo de Nano por su trato, los buenos ratos pasados en estos años y el apoyo: Tomás, David, Tere, María, Vicky, Julio, Olly, Bea, Sergio y por supuesto Nano. Sois todos vosotros los que me habéis aguantado día tras día, café tras café. Antonio, tú también tienes que aparecer junto con Nano por haber sido mis profesores y no haberlo dejado de ser estos años. Feli, otra vez gracias por lo que me has aportado personalmente.

En el departamento a lo largo del pasillo también se encuentra Tere y Regina preparando las prácticas; el L4 con Inés, Jorge, Bárbara, Jana, Eli, Almu, Fernando, Félix, María Morán...; el L2 con Arkaitz, Aini, Tania, María Muñoz, Cristina B, Cristina S, Guille, Manolo...; el L3 con Jesús, Dani.... A todos vosotros, me gustaría agradecer los buenos ratos compartidos y distintas actividades del departamento tanto académicas, científicas como otras más lúdicas. No sólo he encontrado buenos compañeros en vosotros, también muy buenos amigos.

Fuera de la Facultad también tengo que agradecer la colaboración y el apoyo de más gente.

En la Fundación Jiménez Díaz quisiera agradecer muy especialmente a Sonso, Sus, Juanjo, Frank y Nando, fuistéis muy buenos compañeros y sobretodo amigos.

Pedro, gracias por haber contactado con Feli y así poderla haberla conocido, y a Carletes por su ayuda mientras estuve allí.

Quiero agradecer a Dori los buenos consejos que me ha dado a lo largo de este tiempo y la energía que derrocha tanto fuera como dentro del trabajo.

Gracias a Lourdes y a María, empecé con vosotras en el mundo de la investigación y desde entonces, han sido muchos momentos importantes compartidos. María, gracias por haberme dado la oportunidad de volver a trabajar contigo, ha sido un auténtico placer.

Gracias también a los integrantes de mi actual laboratorio: Rafael, M^a José, Manuel, Macu, Cristina, Marita y María. A mis nuevos compañeros del Hospital Doce de Octubre espero no haber sido muy pesada con la escritura.

Bueno, casi estoy llegando al final, o al principio según se mire, gracias a mi profesora de Biología, Teresa que siempre confió en que conseguiría lo que me propusiese. Muchísimas gracias a Bego, Carmen, Adri, Pili, Susana, porque sabéis a lo que he renunciado estos años, me conocéis desde hace bastante más tiempo, ¿verdad?.

Por último me gustaría dar las gracias por quererme y aguantarme estos años, a todos los miembros de mi familia.

A todas estas personas gracias.

INDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

▪ MUERTE CELULAR	
1. Apoptosis	3
2. Necrosis	5
▪ ELEMENTOS IMPLICADOS EN EL PROCESO DE APOPTOSIS	
1. Familia de proteínas caspasas	7
2. Familia de proteínas Bcl-2	9
3. Disipación del potencial de membrana mitocondrial	13
▪ RUTAS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS	
1. Ruta intrínseca o mediada por mitocondria	16
2. Ruta extrínseca o mediada por receptores	17
▪ FUNCIÓN REGULADORA DE PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)	19
▪ ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE p38-MAPK	
1. Elementos de la familia p38-MAPK	23
2. Localización celular y estructura de p38-MAPK	23
3. Regulación de p38-MAPK	
3.1. <u>Activación</u>	25
3.2. <u>Desactivación</u>	26
3.3. <u>Inhibidores farmacológicos</u>	26
4. Substratos de p38-MAPK	26
5. Función de p38-MAPK	28
▪ AGENTES INDUCTORES DE APOPTOSIS	
1. Estrés oxidativo	30
2. Agentes citotóxicos	32
▪ MECANISMOS DE DEFENSA CELULAR	
1. Glutation	37
2. Proteínas de estrés	39
▪ LÍNEAS CELULARES DE TÚBULO PROXIMAL RENAL	41

OBJETIVOS	43
------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

▪ MATERIALES

▪ MATERIAL BIOLÓGICO

- 1. Líneas celulares 44
- 2. Condiciones de cultivo celular 44

▪ MATERIAL NO BIOLÓGICO

- 1. Agentes y tratamientos celulares 45
- 2. Material fotográfico 46

▪ MÉTODOS

▪ ANÁLISIS DE PARÁMETROS CELULARES

- 1. Cuantificación de células apoptóticas
 - 1.1. Por microscopia de fluorescencia 47
 - 1.2. Por citometría de flujo 47
 - 1.3. Por colorimetría 48
- 2. Valoración del peróxido de hidrógeno celular 49
- 3. Medida del potencial de membrana mitocondrial 49
- 4. Valoración de actividad caspasa 50
- 5. Determinación del glutatión celular 50
- 6. Análisis de platino celular por TXRF 51
 - 6.1. Determinación de cisplatino intracelular 52
 - 6.2. Determinación de cisplatino unido a ADN 52

▪ PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

- 1. Preparación de proteínas
 - 1.1. Obtención de extractos proteicos totales 53
 - 1.2. Obtención de extractos proteicos citosólicos 53
 - 1.3. Valoración de proteínas 54
- 2. Análisis de proteínas por “Western” blot 54
- 3. Relación de anticuerpos utilizados 54

▪ TRANSFECCIONES CON VECTORES DE EXPRESIÓN

- 1. Preparación y análisis de los plásmidos 56
- 2. Transfecciones transitorias 56

▪ ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS 57

RESULTADOS

1. Modelo experimental	58
2. Apoptosis inducida por distintos nefrotóxicos en células NRK-52E quiescentes	59
3. Efecto de cisplatino en el ciclo celular	62
4. Implicación de MAP quinasas en la apoptosis inducida por cisplatino en células NRK-52E quiescentes	
4.1. Efecto de cisplatino en MAPKs.	63
4.2. Efecto de la inhibición de MAPKs en la apoptosis	64
4.3. Efecto de la modulación de p38-MAPK en apoptosis	65
5. Papel de MAP quinasas en la apoptosis inducida por	
5.1. Arsenito y cadmio en células NRK-52E	65
5.2. Cisplatino en células LLC-PK1, HK2 y MDCK	68
5.3. Cisplatino en células NRK-52E proliferantes	68
6. Regulación de la apoptosis por p38-MAPK	
6.1. Participación de proteínas de choque térmico	70
6.2. Papel de las caspasas 8 y 3	72
6.3. Translocación de citocromo c y disipación del potencial de membrana mitocondrial	75
6.4. Implicación de proteínas de la familia Bcl-2	77
7. Relación de p38-MAPK con elementos de control temprano de la apoptosis	
7.1. Activación de la proteína p53	81
7.2. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	81
7.3. Contenido de GSH	83
7.4. Contenido intracelular de platino y platinación del ADN	85

DISCUSIÓN

1. Análisis de las condiciones experimentales	87
2. Elementos implicados en el proceso	88
3. Regulación por p38-MAPK	89

CONCLUSIONES

94

BIBLIOGRAFÍA

95

ABREVIATURAS

$\Delta\psi_m$: Potencial de membrana.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AIF: Factor inductor de apoptosis.

ANT: Translocasa de nucleotidos de adenosina.

ATP: Trifosfato de adenosina.

Apaf-1: Factor de activación de apoptosis.

As₂O₃: Trióxido de arsénico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

BHA: Hidroxianisol butilado.

BSO: L-butionina-[S,R]-sulfoximina.

CARD: Dominios de activación y reclutamiento de caspasas.

CDDP: Cisplatino.

CdCl₂: Cloruro de cadmio.

Cytc: Citocromo c.

DAPI: 4',6'-diamino-2-fenilindol.

DED: Dominios efectores de muerte.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

EGTA: Ácido [etilen-bis(oxietilenamino)] tetra-acético.

ERKs: Quinasas reguladas por señales extrcelulares.

FBS: Suero bovino fetal

GSH: Glutation reducido.

GSSG: Glutation oxidado.

HSP: Proteína de choque térmico.

H₂DCF-DA: Diacetato de diclorofluoresceína.

H₂O₂: Peóxido de hidrogeno.

IP: Yoduro de propidio.

JNK: Jun quinasa N-terminal.

kDa: Kilodalton.

LB: Medio Luria Bertani.

MTP: Poro de transición mitocondrial.

MAPKs: Quinasas activadas por mitógenos.

MTP: Poro de transición mitocondrial.

NAC: N-Acetil cisterna.

NP-40: Nonidet P-40.

NSCC: Canales catiónicos no selectivos.

OCT: Transportadores de cationes orgánicos.

OH·: Radical hidroxilo.

ONOO⁻: Peroxinitrito.

O₂^{-•}: Anión superóxido.

PARP: Poli (ADP-ribosa) polimerasa.

PBS: Tampón fosfato salino.

PKC-δ: Proteína quinasa C delta.

RNasa: Ribonucleasa.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

R123: Rodamina 123.

SAPK: Proteína quinasa activada por estrés.

SD: Desviación estándar.

SDS: Duodecil sulfato sódico.

tBid: Bid truncado.

TXRF: Fluorescencia total de rayos X.

T-TBS: Tween-Tris-borato-sódico.

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje.

Z-VAD, Z-VAD-fmk: Z-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona.

INTRODUCCIÓN

MUERTE CELULAR

La evolución ha dotado a los organismos pluricelulares de complejos y precisos mecanismos de control que permiten la regulación de procesos tan importantes como proliferación, diferenciación y muerte celular, gracias a los cuales los seres vivos pueden mantener el equilibrio celular interno del organismo u homeostasis de los tejidos. Durante el proceso evolutivo se han desarrollado mecanismos para la eliminación de células anormales, peligrosas u originadas en exceso, para evitar el efecto perjudicial que éstas pudieran producir en el resto del individuo. Estos mecanismos participan en procesos tan diversos como el desarrollo embrionario, morfogénesis, remodelación tisular o respuesta inmune.

La idea de la existencia de un proceso de muerte celular de origen fisiológico o patológico fue desarrollada hace más de 160 años por Vogt (1842). Sin embargo, hubo que esperar muchos años para la aparición del término “muerte celular programada”, originado por Lockshin (1964), que hacía referencia a la muerte sufrida por ciertas células del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Estos investigadores observaron que algunas células de éste gusano estaban programadas para morir. En 1972, Kerr, Willie y Currie propusieron la clasificación de los procesos de muerte en dos amplias categorías. El término de necrosis, que por entonces englobaba todas las formas de muerte, pasó a denominar un tipo de muerte rápida y violenta observada tras una alteración ambiental severa. En contraposición, aparecía el término de origen griego apoptosis, que significa la caída de la hoja, y que englobaba un proceso de muerte más controlado que desempeñaría una función complementaria a la mitosis en la regulación de las poblaciones celulares. Actualmente se sabe que tanto la apoptosis como la necrosis se producen en los organismos desde la fase embrionaria hasta la senescencia del organismo adulto.

La apoptosis se define como un proceso de suicidio celular, genéticamente controlado, caracterizado por la síntesis de nuevas macromoléculas en algunos casos, una gran demanda energética, y unas características morfológicas y bioquímicas fácilmente distinguibles. Este proceso de muerte puede originarse fisiológicamente, como en el desarrollo y la homeostasis de linfocitos (Rathmell y Thompson, 2002), o como respuesta a situaciones traumáticas tales como exposiciones a drogas antitumorales (Hickman, 1992; Troyano y col., 2001), metales pesados (Galan y col., 2000; Miguel y col., 2005), hipertermia, sustancias oxidantes, infecciones virales, etc. Alteraciones en el desarrollo de la apoptosis son la causa de un gran número de patologías humanas de extrema gravedad como cáncer, enfermedades autoinmunes,

Alzheimer, Parkinson, SIDA, etc...(Barr y Tomei, 1994; Cotman y Anderson, 1995; Thompson, 1995; Hanahan y Weinberg, 2000).

Tanto los mecanismos de regulación como los rasgos morfológicos y bioquímicos observados durante la ejecución del proceso de apoptosis están altamente conservados a lo largo de la evolución, por ello, la apoptosis observada en el gusano *C.elegans* es muy similar a la sufrida por células de mamífero (Mlejnek y Prochazka, 2002).

En contraposición a la apoptosis, a la necrosis se le consideró un proceso pasivo y no fisiológico originado por un daño celular severo, en la mayoría de las ocasiones más importantes que el inductor de apoptosis. Posteriormente se ha demostrado que ambos tipos de muerte pueden coexistir en un mismo tejido (Ledda-Columbano y col., 1991). Los desencadenantes típicos de la necrosis son traumatismos químicos o físicos severos (Wyllie, 1987) que aunque inicialmente se describieron como procesos puramente pasivos, periódicamente aparecen artículos que muestran la existencia de mecanismos de regulación comunes a los observados en apoptosis, como por ejemplo la pérdida de potencial de membrana mitocondrial (Lemasters y col., 1999) o la oxidación celular (Hampton y Orrenius, 1997). Además tanto la apoptosis como la necrosis pueden ser inducidas por el mismo estímulo en una misma línea celular, dependiendo de las circunstancias experimentales (Eguchi y col., 1997; Guenal y col., 1997; Zhan y col., 1999).

Las características generales de la muerte apoptótica y necrótica son

APOPTOSIS	NECROSIS
Proceso energéticamente activo (dependiente de ATP)	Proceso energéticamente pasivo
Compactación celular	Aumento volumen celular
Mantenimiento estructural de orgánulos	Rápida lisis de orgánulos
Mantenimiento de la funcionalidad de la membrana plasmática	Rotura rápida de la membrana plasmática
Fagocitosis de cuerpos apoptóticos que evita el desarrollo de un proceso inflamatorio	Lisis celular, producción de inflamación y daños a células vecinas
Pérdida del contacto célula-célula	Mantenimiento de uniones celulares

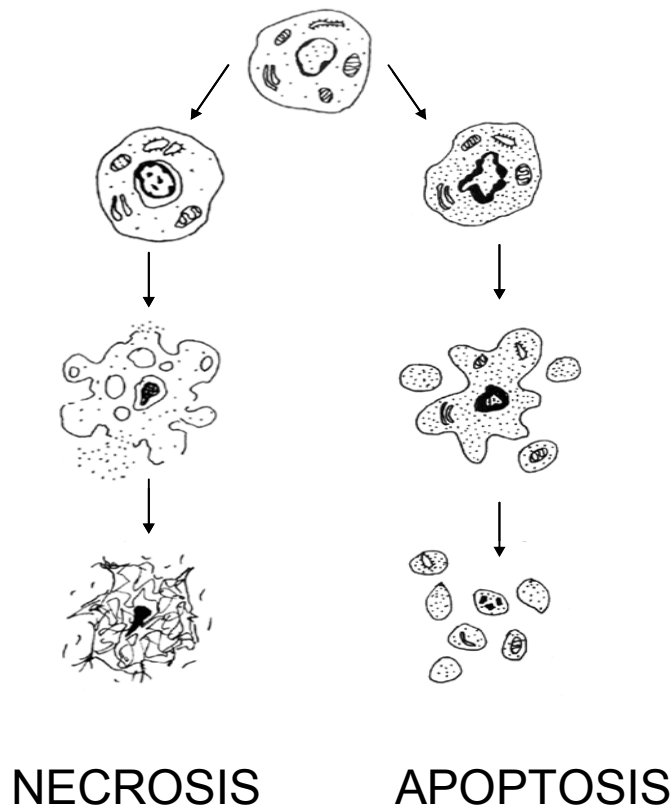


Figura 1. Características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis y necrosis.

1. Apoptosis

Independientemente del agente inductor que desencadene el proceso de apoptosis, las células que sufren este tipo de muerte comparten una serie de características propias fácilmente distinguibles. La función principal de la apoptosis es la eliminación selectiva de una célula, evitando, a toda costa, el daño a las células adyacentes. Por este motivo, una de las características más importantes de la apoptosis es el mantenimiento íntegro de la funcionalidad de membrana plasmática que evita la salida del contenido intracelular al exterior. En los cultivos celulares *in vitro*, debido a la falta de células con capacidad fagocítica que eliminen los residuos celulares originados durante este tipo de muerte, las células apoptóticas pueden presentar en las últimas fases de este proceso daños en su membrana plasmática del mismo modo que las células que han sufrido necrosis, lo que se denomina necrosis secundaria, para diferenciarla de la necrosis genuina denominada necrosis primaria. La membrana de una célula apoptótica, además sufre la aparición de una serie de ondulaciones en su superficie que en inglés se denomina *blebbing*.

Otra característica típica del proceso apoptótico es la condensación citoplasmática observada, fruto de la pérdida de iones K^+ , Cl^- , e iones inorgánicos. La pérdida de estos iones va acompañada de la pérdida de agua que origina la disminución del volumen celular (Maeno y col., 2000). Además, este proceso se acompaña de una serie de alteraciones bioquímicas como es el cambio en la localización de ciertos fosfolípidos de la membrana plasmática, en concreto la externalización de fosfatidil serina. Este fosfolípido, originalmente enclavado en la cara interna de la membrana plasmática, tras su translocación, marcará a los macrófagos la existencia de cuerpos apoptóticos (descritos a continuación) que, junto con la reducción del volumen anteriormente comentado, facilitará la retirada por fagocitosis de las células muertas por apoptosis (Fadok y col., 1992).

Otro rasgo distintivo de la apoptosis es la condensación y posterior fragmentación internucleosomal del ADN observada en el proceso de muerte, que como principal efecto originará la incapacidad celular para la replicación. Sin embargo, el evento bioquímico más importante observado durante la apoptosis y responsable de las mayorías de las alteraciones anteriormente mencionadas es la rotura específica de infinidad de proteínas celulares llevada a cabo por una familia de cistein-proteasas denominadas caspasas, que se encargan del desmantelamiento celular. Estas proteasas son responsables entre otras cosas, de la desintegración del citoesqueleto, la eliminación del contacto célula-célula, el desmantelamiento de la lámina nuclear, la inhibición de la replicación y de las señales de supervivencia o la activación de las endonucleasas encargadas de la degradación del ADN. Una vez finalizado este proceso de “autodigestión”, los restos celulares son englobados en unas estructuras típicas de apoptosis denominados cuerpos apoptóticos. Estas unidades están compuestas por restos de citoplasma, orgánulos y fragmentos de cromatina que son envueltos en restos de membrana plasmática. Posteriormente, y antes de que su contenido entre en contacto con el medio extracelular, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por células del sistema inmune impidiendo el desarrollo de una respuesta inflamatoria que dañe a las células más cercanas. Esta característica es fundamental para evitar el daño tisular que originaría la liberación al medio extracelular del contenido citoplasmático de las aproximadamente 100.000 células que en cada segundo mueren durante la vida del ser humano (Vaux y Korsmeyer, 1999).

2. Necrosis

Las características de este tipo de muerte son el incremento de volumen mitocondrial, la aparición de vacuolas citoplasmáticas, la pronta destrucción de orgánulos y la rápida pérdida de funcionalidad de la membrana plasmática observada durante las primeras etapas de la necrosis. Este último evento tiene como consecuencia primordial el incremento de volumen celular y origina roturas en la membrana plasmática, produciéndose así un vertido del contenido intracelular al medio externo. Este hecho desencadena el desarrollo de una respuesta inflamatoria por parte del sistema inmune que afectará negativamente al tejido circundante a la célula necrótica. Como responsables del aumento de volumen celular observado en la necrosis se ha propuesto una serie de canales presentes en la mayoría de tipos celulares denominados canales catiónicos no selectivos (NSCC) (Barros y col., 2001a; Barros y col., 2001b). Estos autores sugieren que dichos canales permanecerían cerrados en células normales y su apertura estaría favorecida por especies reactivas del oxígeno y altas concentraciones citosólicas de Ca^{2+} , siendo bloqueados por ATP. Según estos investigadores, tras una señal de muerte, la célula permitiría la activación de los canales K^+ de la membrana plasmática, favoreciéndose la pérdida de este ión y originando la disminución de volumen observada en apoptosis. Al mismo tiempo, se activarían los canales NSCC que originarían el incremento de la concentración citosólica de Na^+ . Este aumento de Na^+ activaría, en presencia de ATP, la ATPasa Na^+/K^+ de la membrana plasmática que permitiría la eliminación de Na^+ intracitoplasmático, originándose un desequilibrio osmótico que conllevaría al aumento de volumen celular propio de la necrosis por una mayor captación de agua. Este hecho originaría además la lisis de orgánulos observada en las primeras etapas de la necrosis.

Otra diferencia fenotípica entre apoptosis y necrosis, es el mantenimiento de las uniones celulares entre las células necróticas que difiere de la pérdida de adherencia y los contactos célula-célula observados en el caso de apoptosis (Majno y Joris, 1995).

Otros autores afirman que en el desarrollo de la necrosis participan una serie de proteasas conocidas con el nombre de catepsinas. Estas proteasas no específicas se encargarían de la degradación celular de una manera similar a las caspasas en el caso de la apoptosis. Así altos niveles de calcio citosólico activarían la calpaina, proteasa dependiente de calcio, que facilitaría la liberación de catepsina y otras hidrolasas de los lisosomas comenzando así la desintegración celular (Syntichaki y Tavernarakis, 2002).

Aunque en este apartado se han diferenciado perfectamente las características típicas de la apoptosis y la necrosis, en realidad existen procesos de muerte celular intermedios que difícilmente pueden ser clasificados como meramente apoptóticos o meramente necróticos al compartir alguna de las características fenotípicas de estos dos tipos de muerte (Leist y Jaattela, 2001). Un ejemplo de ello se observa con la inhibición de alguno de los mecanismos de regulación de la apoptosis, como es el caso de las caspasas. La inhibición de estas proteasas no inhibe la muerte celular en sí misma en la mayoría de los casos, y origina un tipo de muerte celular programada con características propias de la necrosis (Lemaire y col., 1998; Kitanaka y Kuchino, 1999).

ELEMENTOS IMPLICADOS EN EL PROCESO DE APOPTOSIS

1. Familia de proteínas caspasas

Las caspasas (cisteín aspartato proteasas) constituyen una familia de proteasas altamente conservadas en la evolución. Las caspasas se sintetizan como proenzimas que contienen un predominio de una longitud variable que está unido a las subunidades enzimáticas. Cuando se produce la activación proteolítica, se libera el predominio y las subunidades enzimáticas sufren un cambio conformacional para constituir la enzima activa.

Su principal función la tienen en las rutas apoptóticas e inflamatorias (Fischer y col., 2003; Shi, 2004; Launay y col., 2005), por esta razón se pueden asociar en dos subfamilias, dependiendo de la función fisiológica. Las caspasas encargadas del control del proceso inflamatorio engloba a las proteasas de la familia de la caspasa 1 (caspasa 1, 4, 5, 11, 12). La subfamilia de la caspasa 3 (caspasa 3, 6, 7, 8, 9 y 10) engloba a los miembros de los procesos apoptóticos. Sin embargo, la descripción de la caspasa 2, que estructuralmente es muy similar a la familia de la caspasa 1 pero que está implicada en procesos apoptóticos, ha obligado a constituir un tercer grupo de caspasas.

La estructura de la procaspasa esta formada por una región o dominio catalítico y otro regulador. La región catalítica de todas las caspasas se sitúa en el extremo C-terminal del péptido y está constituida por dos subunidades: la subunidad mayor de la enzima activa con pesos muy variables, y la subunidad menor que se encuentra junto a la anterior. En ocasiones, entre estos dos dominios aparece un fragmento que puede ser eliminado durante el proceso de maduración de la caspasa. La región reguladora está localizada en el extremo N-terminal en una posición contigua a la subunidad mayor y es eliminada cuando se activa la proteasa. Su longitud es la característica diferencial entre los tres tipos de dominios conocidos y no suelen estar muy conservados aunque presenten fragmentos comunes que permiten la interacción entre proteínas. El dominio efector de muerte DED, (*Death Effector Domain*) descrito en caspasa 8 y 10 es el más largo, el dominio más corto lo presentan las caspasas 3, 6 y 7 (péptido-N), y el dominio CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*) presente en las caspasas 1, 2, 4, 5, 9, 11, 12.

Las caspasas ejecutoras de la apoptosis (3, 6 y 7), que tienen todas ellas un predominio corto (péptido-N), están en la célula como dímeros, y requieren un proceso de corte en un residuo aspartato para generar dos subunidades grandes y dos

pequeñas. La enzima activa se forma por heterodimerización de estas subunidades, portando dos sitios activos. Estas son las caspasas efectoras más importantes que realizan los cortes de los sustratos celulares en el proceso de muerte celular, bien a otras procaspasas o a otras proteínas intracelulares, preferentemente en dominios efectores de muerte DED.

Las caspasas iniciadoras de la apoptosis (2, 9, 8 y 10), que pueden presentar predominios largos (DED) e intermedios Cardone (1997), se encuentran en la célula como monómeros y requieren dimerización u oligomerización para su activación (Salvesen y Abrams, 2004). Generalmente, son activadas por agentes citotóxicos, generando una cascada de activaciones de otras caspasas o de otros sustratos. Los dominios DED se caracterizan por la presencia de seis o siete α -hélices antiparalelas de carácter anfipático, las cuales permiten el reclutamiento de otras moléculas de señalización o moléculas adaptadoras formando grandes complejos proteicos que promueven las rutas de señalización apoptóticas o inflamatorias (Shi, 2004).

Las caspasas activadas por citoquinas a través de receptor (1, 4 y 5), que presentan todas ellas predominios intermedios Cardone (1997), caracterizan la ruta extrínseca de apoptosis y también de los procesos inflamatorios.

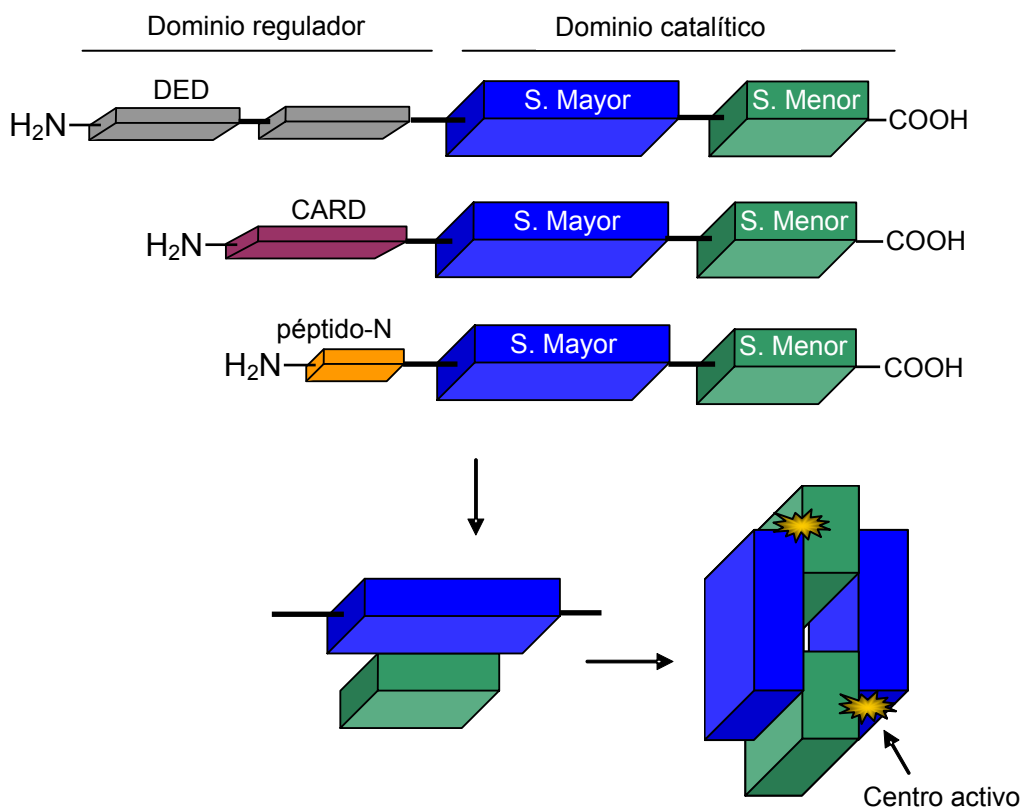


Figura 2. Estructura general de una caspasa.

La activación de las caspasas, también puede ocurrir secundariamente al disparo de las rutas extrínsecas o intrínsecas de apoptosis (Lemasters, 2005; Chipuk y col., 2006). Más de trescientas proteínas han sido caracterizadas como sustratos de caspasas. Receptores de membrana, reguladores citosólicos y proteínas nucleares son las dianas preferidas por las caspasas ejecutoras como caspasa 3, 6 y 7. (Marzo y col., 1998).

2. Familia de proteínas Bcl-2

Bcl-2 es un oncogén que se describe asociado a un *locus* de inmunoglobulinas mediante la translocación t(14:18) en linfomas foliculares (Bakhshi y col., 1985). Es el primer ejemplo de oncogén que inhibe la muerte celular, en lugar de promover la proliferación, como respuesta a múltiples estímulos fisiológicos y patológicos (Vaux y col., 1988; McDonnell y Korsmeyer, 1991). Así, la caracterización de Bcl-2 supuso la aparición de una nueva categoría de oncogenes, aquella que engloba proteínas con capacidad de prevenir muerte celular, en lugar de la capacidad de escapar al control de crecimiento.

Estudios cristalográficos pusieron en evidencia la homología de determinados miembros de esta familia de proteínas con toxinas bacterianas capaces de formar poros en bicapas lipídicas (Muchmore y col., 1996), lo que las relacionó con el proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial. No obstante, existen teorías que sitúan la acción de estas proteínas como reguladoras de la apertura del poro de transición mitocondrial (MTP) (Shimizu y col., 2000a; Shimizu y col., 2000b; Shimizu y Tsujimoto, 2000).

Los miembros de esta familia de proteínas Bcl-2, término que proviene del inglés *B-cell lymphoma/Leucemia 2 gene*, se caracterizan por poseer uno o varios dominios de homología Bcl-2, Shou (2003), que se corresponden con secuencias α -hélice altamente conservadas. Esta superfamilia se divide en dos grupos en función de su capacidad de promover o inhibir la salida de proteínas proapoptóticas de la mitocondria o tres si se considera la función y el número de dominios homólogos (BH) de Bcl-2:

- Los miembros antiapoptóticos como Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1, Bcl-W, tienen cuatro dominios BH (BH1 a BH4) (Boise y col., 1993; Kozopas y col., 1993).
- La subfamilia Bax formada por los miembros proapoptóticos Bak, Bax, Bok y Mtd, poseen tres BH (BH1 a BH3). Los dominios BH1 y BH2 son muy similares a la toxina diftérica (Muchmore y col., 1996).

- La subfamilia “BH3-only” formada por los miembros proapoptóticos Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Hlk, NOXA o PUMA, se caracterizan por presentar un único dominio BH3 (Gross y col., 1999a). Recientemente se ha propuesto una división de este grupo en función de la acción del dominio BH3. Unos miembros actúan directamente como proteínas proapoptóticas, y otros, en cambio, lo harían de forma indirecta mediante una inactivación de las proteínas antiapoptóticas (Letai y col., 2002).

Estas proteínas son capaces de formar homooligómeros o heterodímeros y de esta forma determinar la respuesta mitocondrial. Miembros antiapoptóticos como Bcl-2 o Bcl-X_L tendrían como función impedir la acción de sus rivales proapoptóticos, secuestrando a sus homólogos e impidiendo su cambio de conformación, su oligomerización o la inserción en la mitocondria (Desagher y Martinou, 2000; Perez y White, 2000). En los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 los dominios BH1, BH2 y BH3 estarían formando una estructura a modo de bolsillo hidrofóbico que ocultaría el dominio proapoptótico BH3 (Muchmore y col., 1996; Liang y Fesik, 1997) de forma que quedaría inhibido, impidiendo la oligomerización entre las proteínas proapoptóticas (Chen y Tan, 1998; Kuwana y col., 2002). No obstante, se ha propuesto un mecanismo distinto por el cual las proteínas antiapoptóticas pueden bloquear la oligomerización de Bax y Bak, sin interferir en la interacción de éstas con otros miembros del grupo BH3 (Ruffolo y Shore, 2003). Se ha descrito también que Bcl-2 es capaz de regular la salida de calcio del retículo endoplásmico durante la muerte celular (Foyouzi-Youssefi y col., 2000). Por otro lado, se ha relacionado el aumento de la expresión de miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 con un desequilibrio del estado redox hacia un ambiente más reductor (Ellerby y col., 1996).

El producto del gen *bcl-x* relacionado con el gen *bcl-2*, puede funcionar como un regulador de la apoptosis independientemente de Bcl-2. Del procesamiento alternativo del transcrito *bcl-x*, resultan dos mRNAs de tamaño distinto. El producto del mRNA más grande, Bcl-x_L, es similar en tamaño y estructura a Bcl-2 y el más pequeño, Bcl-x_S, inhibe la capacidad de Bcl-2 de aumentar la supervivencia. *In vivo*, el mRNA de Bcl-x_S se expresa en grandes cantidades en células que tienen alta tasa de recambio, como los linfocitos. Por el contrario, Bcl-x_L se encuentra en tejidos que contienen células de larga vida, como el cerebro adulto. La expresión de Bcl-x_S puede jugar un papel dominante respecto a Bcl-2 en la regulación de la muerte celular; un mecanismo por el cual podría formar un complejo heterodimérico inactivo con Bcl-2. Una explicación alternativa sería que Bcl-x_S y Bcl-x_L podrían unirse directamente al mismo regulador de la apoptosis, como Bcl-2. Esta interacción sería debida al dominio amino-terminal, que muestra un alto grado de similitud entre Bcl-2, Bcl-x_S y Bcl-x_L (Boise y col., 1993).

También se ha planteado que Bcl-x_L puede funcionar como un canal iónico que regula la permeabilidad de la mitocondria (Muchmore y col., 1996; Minn y col., 1997; Vander Heiden y col., 1997).

Dentro de los miembros proapoptóticos, los más importantes son Bax, Bid, Bad y Bak. Estas proteínas se encuentran de forma monomérica en el citosol (Hsu y col., 1997) y pueden sufrir un cambio conformacional específico, en respuesta a una señal de estrés, que permita su oligomerización y su translocación a la mitocondria (Gross y col., 1998) promoviendo la liberación de proteínas mitocondriales proapoptóticas. Aunque estas proteínas pueden tener funciones redundantes, se ha propuesto un mecanismo de regulación diferencial en función del estímulo apoptótico, de manera que una u otra sea la forma predominante (Ke y col., 2001; Mandic y col., 2001).

El mecanismo por el que Bax y Bak promueven la liberación de proteínas es objeto de estudio. Uno de los mecanismos escritos propone que, tras la oligomerización, forman un poro que permite la salida de proteínas que se localizan en el espacio intermembrana (Gross y col., 1998; Jurgensmeier y col., 1998). Este modelo supone la permeabilización, excluidamente de la membrana externa, por lo que la membrana interna permanecería intacta, y no se altera el potencial, la cadena de transporte electrónico o el consumo de O₂ (Shimizu y Tsujimoto, 2000; von Ahsen y col., 2000a). Esta hipótesis se basa en la homología de estas proteínas con las toxinas bacterianas formadoras de poros, y la evidencia de que Bax es capaz de formar poros y de liberar cyt c en liposomas artificiales (Kuwana y col., 2002). Alternativamente, se ha propuesto que estas moléculas interactúan con proteínas del complejo del poro, como el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Shimizu y col., 1999). Por último se ha propuesto un mecanismo de permeabilización mitocondrial en el que las proteínas proapoptóticas inducen y estabilizan un aumento de la curvatura de la membrana mitocondrial externa formando poros lipídicos (Basanez y col., 2002; Kuwana y col., 2002).

En el caso de Bax se ha propuesto que entre los mecanismos iniciadores de la translocación de esta proteína, podrían estar modificaciones del estado redox de la célula y modificaciones en el estado de fosforilación de esta proteína (Hsu y Youle, 1998; Shou y col., 2003; Nutt y col., 2005).

Bid se relaciona de forma crucial con la apoptosis mediada por receptores de muerte debido a que es fragmentado principalmente por la caspasa 8 (Li y col., 1998). El fragmento resultante de la degradación, Bid truncado (tBid), se relocaliza rápidamente en la membrana mitocondrial externa, favoreciendo la permeabilidad de la membrana. Aunque el mecanismo de acción es poco conocido, se ha intentado explicar mediante la eliminación del extremo N-terminal, que le confiere mayor carácter

hidrofóbico (Kudla y col., 2000), así tBid se podría unir a algún factor que facilite su localización mitocondrial, como cardiolipina o dilisocardiolipina, un lípido excluido de la membrana mitocondrial que podría funcionar como receptor intracelular (Esposti y col., 2001; Esposti, 2002). Se postula un mecanismo alternativo por el que tBid se inserta en la membrana mitocondrial debido a que el corte producido por caspasas provoca un aumento en la capacidad de oligomerización espontánea, permitiendo que se asocie con la membrana mitocondrial.

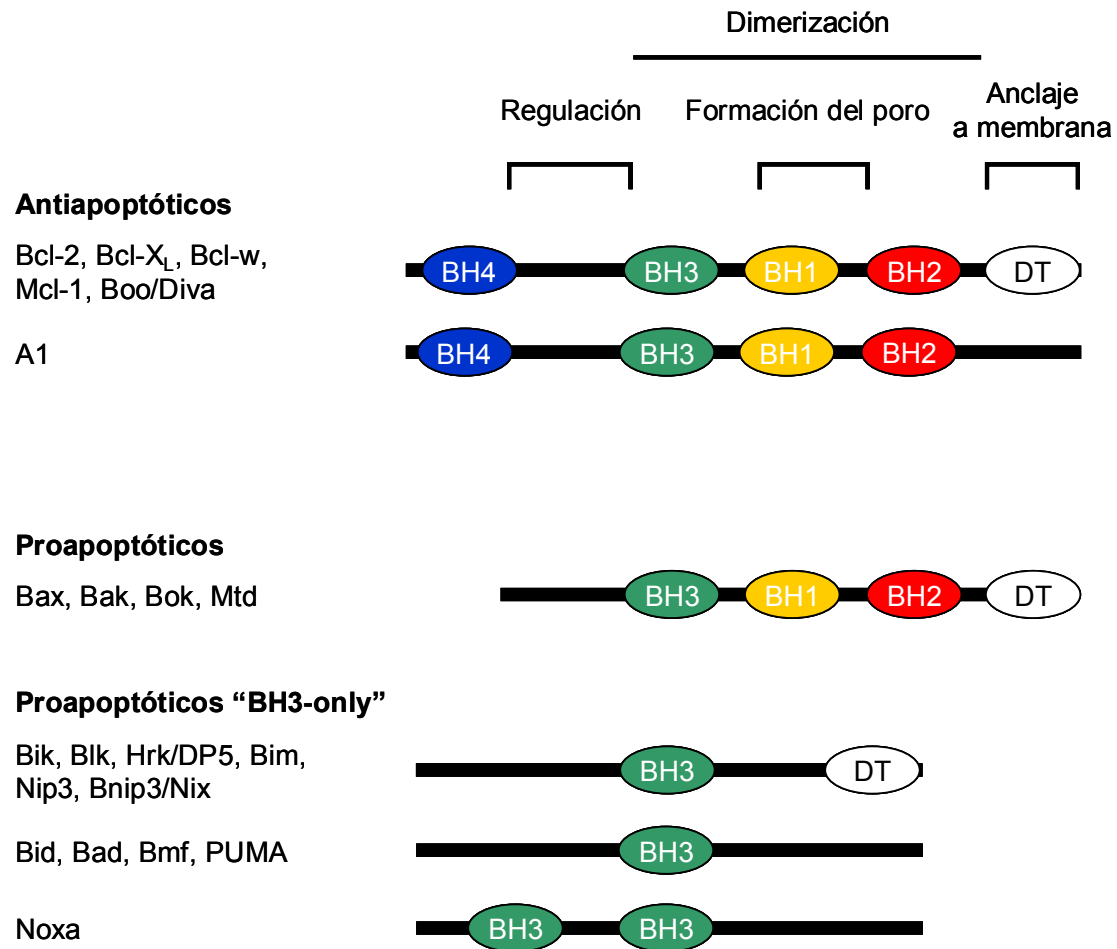


Figura 3. Esquema representativo de los miembros más importantes de la familia Bcl-2. Se muestran los dominios conservados (BH1-BH4), varios dominios funcionales y el dominio de anclaje a membrana (DT) (Kuwana y Newmeyer, 2003).

3. Disipación del potencial de membrana mitocondrial

La cadena respiratoria genera un gradiente de protones sobre la membrana mitocondrial interna que determina un potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) imprescindible para que tenga lugar la fosforilación oxidativa. Las primeras observaciones de la implicación del poro de permeabilidad mitocondrial en apoptosis fueron el descubrimiento de señales de muerte que precedían a la disipación del potencial de membrana antes de que otros signos morfológicos fueran detectados. Precedía, por ejemplo, a la exposición de fosfatidil serina, potencial redox celular (Kroemer, 1997), eventos nucleares en apoptosis como la degradación de ADN genómico (Kroemer y col., 1997). De hecho, la bajada del gradiente parece ser más importante que la activación de caspasas, desde que se comprobó que estas pueden ser activadas sin la consecuente muerte celular siempre que el potencial de membrana se mantenga intacto (Boise y Thompson, 1997; Miossec y col., 1997). Además, en algunos modelos de apoptosis la activación de caspasas y nucleasas no ocurre, mientras que la disipación del $\Delta\psi_m$ si que se observa (Lesage y col., 1997; Lavoie y col., 1998).

El poro de transición mitocondrial (MTP, del inglés *Mitochondrial Transition Pore*) (Crompton, 1999) es un canal multiproteico que comunica el citoplasma con la matriz mitocondrial, atravesando ambas membranas. Este complejo tiene dos funciones: primero, regula la integración del proceso de fosforilación oxidativa en la obtención de energía celular, y segundo, induce la muerte celular cuando se convierte en un canal inespecífico. Este es un canal proteico sensible a Ca^{2+} , fosfato inorgánico, voltaje, especies reactivas de oxígeno (ROS) y pH alcalino, que promoverían que la membrana sufriera un cambio conformacional (Chandra y col., 2000) para permitir su apertura y el paso de solutos de un peso molecular inferior a 1,5 kDa de forma no selectiva (Zoratti y Szabo, 1995; Bernardi, 1996). Este hecho tendría consecuencias catastróficas para la mitocondria porque el potencial de membrana mitocondrial, el cual requiere la impermeabilidad de la membrana interna a los protones, cae y con ello la capacidad de la célula para sintetizar ATP. El bloqueo de la cadena respiratoria dirige la generación de ROS a través de la transferencia directa de electrones a la molécula de oxígeno. Las altas concentraciones de solutos en la matriz mitocondrial generan una presión osmótica que provoca la entrada de moléculas de agua, la expansión de la plegada membrana interna y la eventual interrupción de la membrana externa principalmente liberando factores que ejecutan el programa apoptótico (Grimm y Brdiczka, 2007).

La translocasa ADP/ATP, ANT (del inglés *Adenin Nucleotide translocator*) es una de las proteínas más abundantes del poro mitocondrial (Aquila y col., 1982) que se

encuentra en la membrana mitocondrial interna. Su papel fundamental es transportar ATP que es sintetizado dentro de la mitocondria al citosol, mediante el intercambio de ADP. El intercambio ($\text{ATP}^{4-} / \text{ADP}^{3-}$) crea un gradiente eléctrico por si mismo (Klingenberg, 1980). En la matriz mitocondrial y asociada a ANT nos encontramos una chaperona con actividad peptidil-propil isomerasa, es ciclofilina D (cypD) (Tanveer y col., 1996). Otra de las moléculas básicas del poro es el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), un poro proteico inespecífico también llamado porina mitocondrial (Roos y col., 1982; Benz, 1994) que se encuentra en la membrana mitocondrial externa. ANT y VDAC formarían el núcleo del poro mediante interacciones directas entre ellas, comunicando el citosol con el interior mitocondrial en sitios que se corresponden con una asociación estrecha entre ambas membranas, constituyendo así el poro de transición. Existen varias proteínas que pueden asociarse a este complejo y regular su actividad, como la hexoquinasa (HK) citosólica, la creatín quinasa intermembranal (CK), y miembros de la familia Bcl-2 (Vander Heiden y col., 1997; Beutner y col., 1998). No obstante, puesto que se han observado modelos en los que ocurre la liberación de proteínas mitocondriales mucho antes de ocurrir la disipación del potencial de membrana, se han sugerido mecanismos alternativos (Gogvadze y col., 2001) donde las proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2 permeabilizarían, de forma independiente, la membrana mitocondrial externa específicamente, sin producir una alteración ultraestructural ni una despolarización de la mitocondria (Shimizu y Tsujimoto, 2000; von Ahsen y col., 2000a; Von Ahsen y col., 2000b).

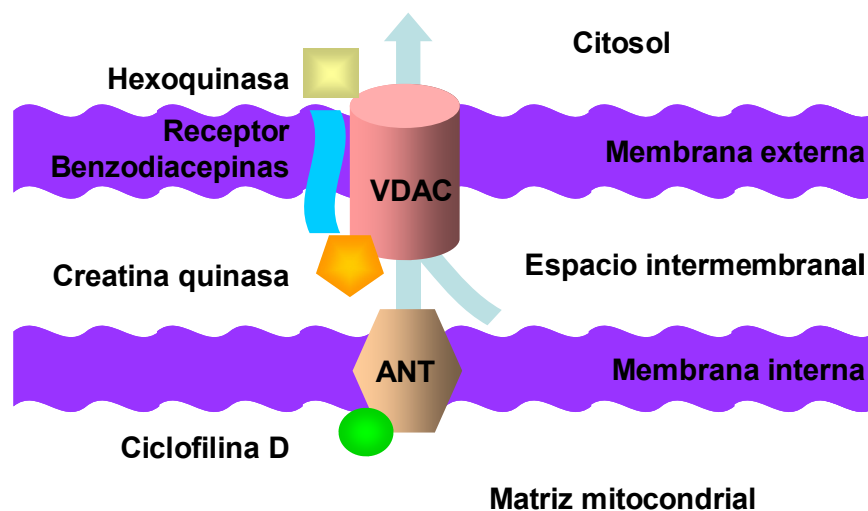


Figura 4. Estructura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial. (Tornero y col., 2002).

RUTAS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

Existen dos familias de proteínas que se consideran el centro de la maquinaria apoptótica: Caspasas que son principalmente las ejecutoras de la apoptosis (Shi, 2002), y la familia de proteínas Bcl-2, las cuales son los principales reguladoras del proceso (Danial y Korsmeyer, 2004). Generalmente, estas familias de proteínas participan en la apoptosis a través de dos vías: la intrínseca y la extrínseca que están relacionadas a través de la proteína Bid. Esta proteína “BH3-only”, es rota por la caspasa 8 y la forma truncada de Bid (tBid) se transloca a la mitocondria y dispara la activación de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, Bax y Bak, dando lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial. En la vía extrínseca, esta permeabilización de la membrana sirve como un bucle amplificador de la activación de las caspasas efectoras (Li y col., 1998; Luo y col., 1998; Gross y col., 1999b). Sin embargo, la caspasa 8 puede activar las caspasas efectoras directamente sin hacerlo a través de la mitocondria.

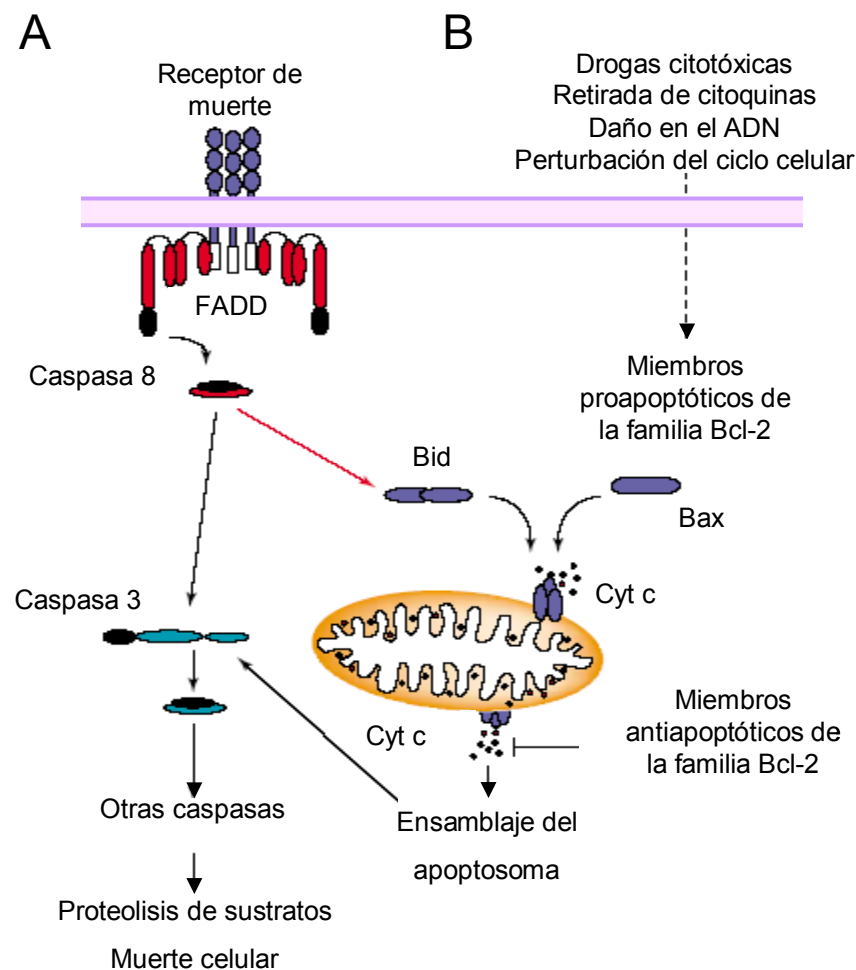


Figura 5. Vías apoptosis. (Adrain y Martin, 2001). A) Ruta extrínseca o mediada por receptores. B) Ruta intrínseca o mitocondrial.

1. Ruta intrínseca o mediada por mitocondria

La ruta intrínseca es utilizada para eliminar células en respuesta a radiaciones ionizantes, drogas quimioterapéuticas, daño mitocondrial y ciertos procesos en el desarrollo. A continuación del disparo de la muerte, la mitocondria puede ser permeabilizada selectivamente, liderando la liberación del citocromo c y el reclutamiento y la activación de las caspasas de la vía intrínseca, la caspasa 9, en un complejo conocido como apoptosoma (Zou y col., 1999).

La ruta intrínseca incluye la activación de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 que ejercen su función en la mitocondria por inducción de la permeabilización de la membrana mitocondria externa. La liberación de diferentes proteínas proapoptóticas, que están normalmente presentes en el espacio intermembrana de estos orgánulos, se ha observado durante las etapas iniciales de la muerte celular por apoptosis (Cai y col., 1998; Green y Reed, 1998).

La liberación del citocromo c (Cyt c) desde la mitocondria es un paso clave en el inicio del proceso apoptótico. Los mecanismos que regulan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de las proteínas del espacio intermembrana presumiblemente depende del tipo celular y de la naturaleza del estímulo apoptótico (Gogvadze y col., 2006).

Una vez en el citosol, holocitocromo c (que se forma dentro de la mitocondria) se asocia a la región C-terminal del factor de activación de apoptosis (Apaf-1) que contiene 12-13 repeticiones de unión proteína-proteína (WD40). Esta interacción facilita la unión de dATP con Apaf-1 y la exposición de su motivo CARD N-terminal, el cual puede ahora oligomerizar y formar una plataforma de activación de la procaspasa 9. El resultado de la oligomerización de Apaf-1 es un complejo capaz de reclutar varias moléculas de procaspasa 9 inactivas a través de interacciones heterotípicas CARD-CARD para formar el llamado apoptosoma. El apoptosoma entonces activa las caspasas iniciadoras (Cain y col., 2002; Shi, 2004). La caspasa 9 activa, rompe y activa sucesivamente, la pro-caspasa 3 y 7 que son las responsables de la rotura de varias proteínas que lideran las características químicas y morfológicas de la apoptosis. (Robertson y col., 2000). Además del citocromo c, la mitocondria libera una serie de proteínas que están implicadas en la ejecución de una forma alternativa de apoptosis independiente de la actividad de caspasas. Estas proteínas, tras ser liberadas al citoplasma, son transportadas al núcleo donde participan en la fragmentación de alto peso molecular del ADN (Daugas y col., 2000; Joza y col., 2001). Las proteínas que participan en la rotura del ADN son endonucleasa G (Endo G) y el factor de inducción de apoptosis (AIF), una flavoproteína de 57 kDa (Arnoult y

col., 2003). Debido a diferencias en la forma y en el tamaño, así como a las cinéticas de difusión, se presume que es un poro distinto de MTP, e incluso, que es la ruptura de la membrana mitocondrial externa la que permitiría la liberación de estas dos proteínas (Springs y col., 2002; Arnoult y col., 2003). Recientemente un canal lipídico compuesto por ceramida y llamado canal de ceramida se ha visto implicado en la liberación de factores apoptogénicos desde la mitocondria. La ceramida difiere de otros lípidos en que pueden formar puentes de hidrógeno intermoleculares para producir columnas de ceramida, cada columna de ceramida formaría canales con distintos estados de conductancia capaces de la liberación de proteínas de más de 60 kDa (Siskind, 2005).

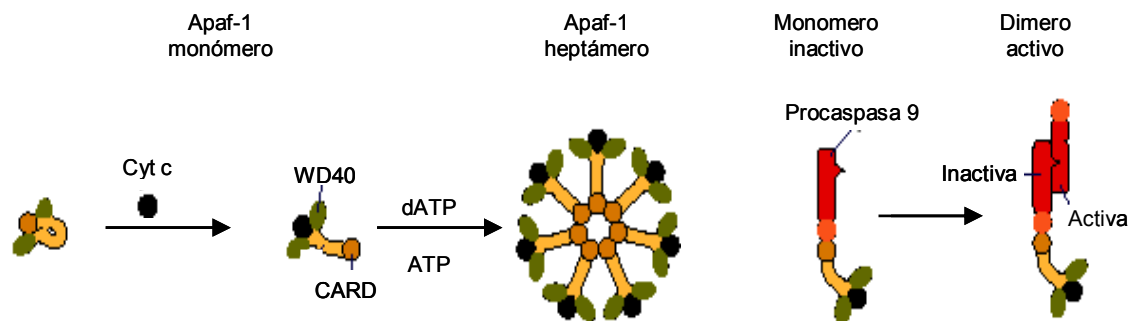


Figura 6. Modelo para la activación de Apaf-1 y procaspasa 9. (Adams y Cory, 2002)

2. Ruta extrínseca o mediada por receptores

La ruta extrínseca es responsable de la eliminación de células durante el desarrollo, la maduración del sistema inmune y la eliminación de tumores mediada por el sistema inmune. Se inicia por la unión de ciertas citoquinas sobre un receptor transmembrana perteneciente a la superfamilia de los receptores para el factor de necrosis tumoral tipo 1, Fas, TNF y TRAIL (Shi, 2004).

Uno de estos receptores lo constituyen Fas (también conocido como CD95 ó APO-1) y su ligando, FasL. FasL se une a Fas en la misma célula o células adyacentes, formándose grupos de tres o más moléculas de Fas. A causa de esta agregación, los dominios de muerte intracelulares de estos receptores agrupados por Fas se unen a una proteína adaptadora que contiene un dominio de muerte citosólico FADD (del inglés *Fas-associated death domain*) mediante un mecanismo de varios pasos

(Algeciras-Schimnich y col., 2002). FADD se fija a la forma inactiva de la caspasa 8 mediante interacciones homofílicas con su dominio N-terminal efector de muerte (DEDs). Es dentro de este complejo señalizador inductor de muerte (DISC) donde la caspasa 8 es activada (Salvesen y Dixit, 1999). La activación total de la enzima sucesivamente promoverá la ruptura de sustratos específicos y de la caspasa 3 ejecutora. Esto último dará lugar a la rotura de distintas dianas celulares y a la muerte por apoptosis (Medema y col., 1997).

FUNCIÓN REGULADORA DE PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)

Filogenéticamente, las MAP quinasas pertenecen al grupo de CMGC proteínas quinasas, las cuales incluyen las quinasas dependientes de ciclina (CDKs), glicógeno sintasa quinasa, y las quinasas como CDK (Manning y col., 2002). Los miembros de la familia MAP quinasa muestran más del 40% de identidad de aminoácidos con el dominio de la quinasa ERK1. Una de las características distintivas de estas moléculas es la presencia de un motivo Thr-Xaa-Tyr en el lazo de activación, que es un sitio de activación por fosforilación por los miembros de la familia MAP2K (M2K 1-7). Sin embargo no todas las MAP quinasas están reguladas de esta manera. Este motivo está ausente en ERK3, ERK4 y quinasa “Nemo-like” (NLK), donde un residuo de glicina o de ácido glutámico reemplaza la tirosina. ERK7 contiene el motivo Thr-Glu-Tyr en el lazo de activación, sin embargo, no existen evidencias de que sea sustrato de la familia MAP2K, parece ser que la fosforilación de ERK7 es catalizada por si misma (Abe y col., 2001; Klevernic y col., 2006). De este modo, las diferentes subfamilias de MAP quinasas no se organizan siempre en la clásica cascada de MAP3K-MAP2K-MAPK, de este modo se pueden clasificar las MAP quinasas en convencionales o atípicas. Las MAP quinasas convencionales incluyen ERK1/2, p38s, JNKs, y ERK5, son todas sustratos de MAP2Ks y las MAP quinasas atípicas incluyen ERK3/4, NLK y ERK7, que no lo son (Coulombe y Meloche, 2007).

Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) son una familia de serin-treonin quinasas que deciden el destino de procesos celulares tan importantes como el crecimiento celular, proliferación, muerte y diferenciación en respuesta a una serie de estímulos (Pearson y col., 2001). Entre los miembros de la familia MAPK, los mitógenos y factores de crecimiento frecuentemente activan la ruta ERK1/2, mientras que el estrés y procesos inflamatorios constituyen el principal desencadenante de la cascada de JNK y p38, algunas veces referidas como “proteínas quinasas activadas por estrés”. Por tanto, median respuestas a choques osmóticos, citoquinas inflamatorias y otras agresiones frecuentemente asociadas con decisiones de supervivencia y apoptosis (Nebreda y Porras, 2000)

Las cascadas de señalización de las MAPKs se organizan en módulos individuales, que se inician por estímulos extracelulares a través de distintos receptores y mediadores. La activación de una MAPK se consigue a través de una cascada lineal de señalización en la cual signalosomas asociados a membrana activan una MAPK quinasa quinasa (MAP3K) que fosforilan y activan una MAPK quinasa

(MAPK2). Esto se traduce en una fosforilación dual de las MAPKs en un dominio de tres aminoácidos conservado, Thr-X-Tyr, y en un incremento en la actividad catalítica de la MAPK. Las MAPKs fosforilan residuos de Ser/Thr seguidos por una prolina de sustratos nucleares y citosólicos que incluyen importantes factores de transcripción y diferentes efectores. Estos entonces impactan el programa genético celular o el control de decisiones de proliferación como es el caso del módulo ERK, sobre apoptosis o diferenciación como es a menudo el caso de las rutas de JNK y p38, y sobre otras funciones citosólicas que incluyen migración celular, hipertrofia, transducción sensorial, respuestas metabólicas y muchas otras (Shi y col., 2006).

A pesar de este patrón de activación común, existen estrictas especificidades dentro de cada módulo MAPK, preservando un cierto grado de linealidad dentro de cada ruta. Las quinasas superiores son a menudo muy selectivas, y no entrecruzan miembros de diferentes unidades MAPK, en algunos casos MAPK2s pueden discriminar entre isoformas de un módulo dado (Mayor y col., 2007).

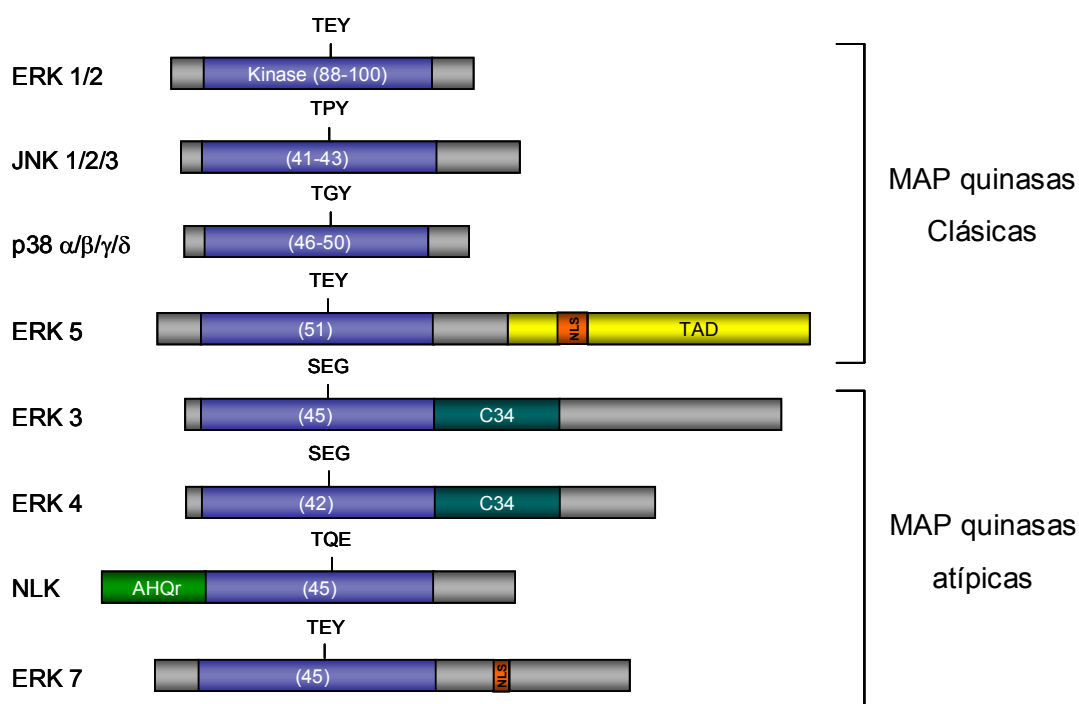


Figura 7. Estructura esquematizada de las MAP quinasas humanas. Las MAP quinasas se componen de un dominio quinasa (en azul) flanqueado por extremos N y C-terminales de longitudes variables. La identidad de los dominios quinasas con ERK1 se indica. El motivo de activación por fosforilación se indica para cada quinaza. TAD dominio de transactivación; NLS: secuencia de localización nuclear; C34: región conservada en ERK3/4; AHQr, dominio rico en alanina (A), histidina (H) y glutamina (Aquila y col., 1982; Coulombe y Meloche, 2007).

La ruta ERK1/2 responde generalmente pero no exclusivamente a activadores de receptores tirosín quinasa y receptores acoplados a proteínas G. Las principales ERKs de mamífero, p44^{ERK1} y p42^{ERK2}, son activadas por las quinasas MEK1 y MEK2 con especificidad dual (Ser/Thr y Tyr) que fosforilan el motivo TEY específico de las ERKs. Los efectores de las ERKs activas incluyen factores de transcripción (Elk-1, Ets 1, Sap1a, m-Myc), transductores de señal y activadores de señales de transcripción (STAT), proteínas adaptadoras (Choudhury y col., 1997), enzimas quinasa (p90RskS6, fosfolipasa A₂), y receptores de superficie celular y nuclear [factor de crecimiento epidérmico (EGF) y receptores estrogénicos]. El estudio de las consecuencias fisiológicas de la señalización de ERK se ha visto facilitado por la disponibilidad de inhibidores farmacológicos de la acción de ERK, como PD98059 y U0126 entre otros. Ambos inhibidores bloquean la señalización de ERK a través de la inhibición de sus activadores inmediatamente situados por arriba MEK1 y MEK2. La especificidad no es absoluta; PD-98059 es también un potente inhibidor de la ciclooxigenasa 1 y 2. Desde una perspectiva fisiológica, la señalización por ERK se implica en mitogénesis y diferenciación celular (Tian y col., 2000).

Los miembros de la familia JNK [(también conocidas como proteínas quinasa-1 activada por estrés (SAPK1)] responden generalmente a estrés celular como hipertoncicidad, luz ultravioleta, choque térmico, y citoquinas proinflamatorias, miembros de esta familia incluyen las ampliamente expresadas JNK1 (también conocida por p46 o SAPK1 γ) y JNK2 (también conocida como p54 o SAPK1 α), así como la específica de cerebro JNK3 (también conocida como p49 o SAPK1 β). Por procesamiento alternativo se obtienen las proteínas y la activación tiene lugar por fosforilación dual de los motivos TPY. Efectores de la familia JNK incluyen principalmente factores de transcripción (c-Jun, Elk-1, ATF2, DPC4, NFAT4, y p53). La proteína activadora-1 (AP1), la curcumina inhibidor del factor nuclear- κ B, y, dicoumarol y menadiona inhibidores de las quinonas reductasas, bloquean la activación de JNK y la señalización dependiente de JNK. JNKs, *in vivo*, parece que participa en procesos de inflamación, tumorigénesis, y apoptosis. (Tian y col., 2000).

La familia p38 (también conocida como SAPK2) incluye cuatro isozimas (α - δ) que son similares en tamaño (360-32 aminoácidos) poseen un 60-75% de homología entre ellos, y todos son activados en respuesta a estímulos estresantes extracelulares como son el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleuquina-1 (IL-1), radiación UV y choque osmótico (Raingeaud y col., 1995) de la misma forma que la familia JNK. p38 es activada por MAPKKs, que incluyen MKK3 \cdot , MKK6, y JNKK1, que fosforilan con especificidad dual los motivos TGY (residuos de treonina 180 y tirosina 182). Los

efectores de la familia p38 incluyen factores de transcripción (ATF-2, Elk-1, CHOP/Gadd15), Max, MEF2C) y enzimas (MAPKAP quinasa). La ruta MAP3K de p38 pueden incluir Tak1, Ask1, y MLK (Nemoto y col., 1998).

La ruta p38 juega un papel importante en apoptosis. Se ha demostrado que muchas señales apoptóticas estimulan la actividad de p38 y que esta activación se correlaciona fundamentalmente con la inducción de apoptosis en varios tipos celulares.

MÓDULO: RECEPTOR	ERK RTKs, GPCRs	JNK Citoquinas, GPCRs	p38 Estrés, Citoquinas
MAP3K	Raf, TPL2	MEKK, MLK, TAK, ASK, TPL2	MEKK, MLK, TAK, ASK, TPL2
MAP2K	MEK 1/2	MKK4/7	MKK3/6
MAPK	ERK 1/2	JNK1/2/3	P38$\alpha/\beta/\gamma/\delta$
SUSTRATOS	Elk1, c-myc, MK1, Ets1/2, Rsk2/3, Mnk1/2	C-Jun, JunD, ATF2, Elk1, Sap1	MKK2/3/5, ATF2, MEF2C, GAD153, Msk1, Mnk1. Sustratos n6veles: EE1A, Rab5GDI, EGFR, Tau

Figura 8. Estructura general de la señalización por MAPKs. Señales extracelulares, receptores y efectores intracelulares de cada cascada de MAPK muestran que los niveles de cada ruta de quinasas están organizadas en pasos rígidos. Las rutas menos caracterizadas, como ERK5, se omiten. EGFR, factor de crecimiento epidérmico; Rab5GDI, complejo formado por Rab5 y GDI (*guanine-nucleotide dissociation inhibitor*); GAD153, proteína de arresto celular inducible por daño en ADN (Mayor y col., 2007).

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE p38-MAPK

1. Elementos de la familia p38-MAPK

p38-MAPK pertenece a una familia de proteínas Serina/treonina quinasa que fueron descubiertas en el año 1994 (Han y col., 1994) debido a su fosforilación en respuesta a endotoxinas y choque osmótico, y poseer una alta homología con una proteína *HOG1* descrita en *Saccharomyces cerevisiae* (Brewster y col., 1993). La proteína p38 fue originalmente identificada como un activador de MAPKAK-2, posteriormente fue purificada y la copia de su ADN fue clonada y caracterizada como una molécula que se unía a derivados de pirimidazoles, (inhibidores de la producción de citoquinas inflamatorias) y de ahí que fuera nombrado como CSPB (Lee y col., 1994).

La familia de p38-MAPK está compuesta por 4 isoformas. Las isoformas p38-MAPK α (SAPK2A) y p38-MAPK β (SAPK2B) (Han y col., 1994) son los componentes mayoritarios y se expresan en todos los tejidos de una forma ubicua en el caso de modelos murinos. La isoforma p38-MAPK γ (SAPK3/ERK6) (Lechner y col., 1996; Li y col., 1996; Cuenda y Dorow, 1998) de expresión preferente en músculo y por último, la isoforma p38-MAPK δ (SAPK4) que se expresa mayoritariamente en pulmón y riñón (Jiang y col., 1996; Kumar y col., 1997). En el caso de la especie humana, aunque el patrón de expresión de las diferentes isoformas varía dependiendo del tejido en el que se encuentren, la expresión de las isoformas α , β son ubicuas mientras que la expresión de la isoforma γ se da en músculo esquelético (Li y col., 1996; Court y col., 2002), corazón, pulmón, timo y testículo. Por último la expresión de la isoforma δ se expresa en pulmón, páncreas, intestino delgado, riñón, testículo y epidermis (Kumar y col., 1997; Dashti y col., 2001).

2. Localización celular y estructura de p38-MAPK

La localización celular de la proteína p38-MAPK es un tema controvertido ya que en células quiescentes no queda claro lo que ocurre tras ser estimulada. Existen evidencias de que p38-MAPK se transloca al núcleo tras su activación (Raingeaud y col., 1995), aunque hay otra serie de evidencias que demuestran que tras su activación se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma (Ben-Levy y col., 1998).

El estudio cristalino de las MAP quinasas ha permitido resolver la conformación del sitio catalítico, el cual descansa en un bolsillo entre dos dominios, uno constituido por los residuos del extremo N-terminal más una cadena hacia el extremo C-terminal, lazo 16 (L16) y el otro compuesto por los residuos del extremo C-terminal. Estos dominios están conectados por un eje de cadena única que está centrado alrededor de la Gly-110 en p38 α (Gly-113 en p38 γ) (Bellon y col., 1999). L16 puede estar contribuyendo al control de la relación entre los dos dominios que son relativamente rígidos. Thr-180 y Tyr-182 están localizados en un “borde de activación” flexible que guarda el sitio activo, una fosforilación dual induce al lazo moverse hacia abajo para que el sustrato tenga mejor acceso y que los dominios N- y C-terminal giren como cuerpos rígidos sobre el eje, lo cual altera la conformación del sitio catalítico hacia un estado más activo (Canagarajah y col., 1997; Bellon y col., 1999). El dominio ácido común de acoplamiento (CD) está compuesto por tres residuos cercanos de ácido aspártico: Asp-313, Asp315 y Asp316 (Tanoue y col., 2001), que se sitúan en el L6 cerca de Tyr-323 interacciona con los dominios de acoplamiento (D) de MAPKKs, inhibidores de fosfatasas y proteínas del esqueleto y distintos sustratos que consisten en dos o más residuos básicos.

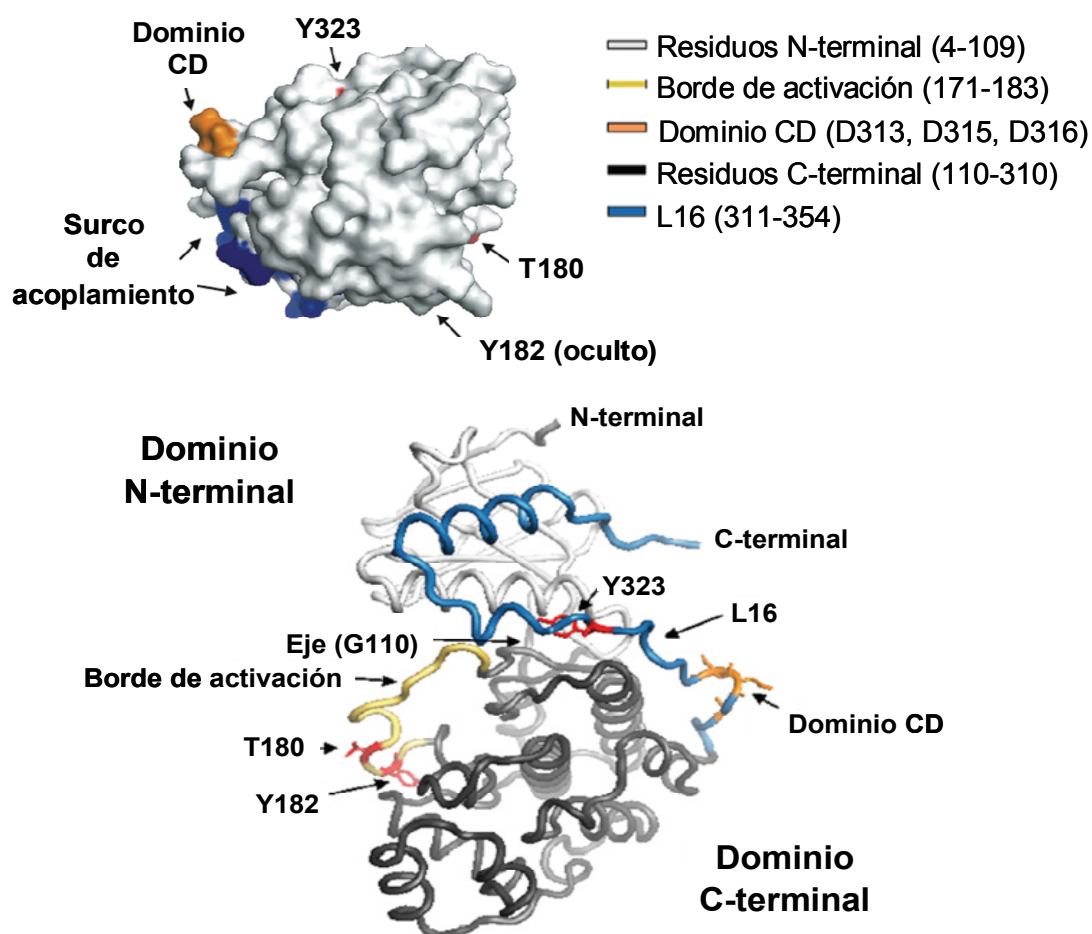


Figura 9. Representación del esqueleto peptídico de p38 (Mittelstadt y col., 2005).

3. Regulación de p38-MAPK

3.1. Activación

Cuando los factores de crecimiento se unen a sus receptores específicos se autofosforilan, dejando grupos fosfato accesibles para su reconocimiento por moléculas adaptadoras como pueden ser factores intercambiadores de Guanina, que llevan finalmente a la activación de pequeñas proteínas G con actividad GTPasa. Un ejemplo sería el caso de Ras que activa la ruta de ERK, o el caso de la familia Rho, que activa la ruta de p38-MAPK y JNK (Coso y col., 1995).

Dentro de las MAPKKK responsables de la activación de p38-MAPK, podemos destacar MTK1, MLK2, MLK3, DLK, ASK1 y TAK1. Cuanto más subimos en la cascada de transducción de señales menor es la especificidad de la activación.

Dentro de las MAPKK, la activación de p38-MAPK se da gracias a dos activadores fundamentales que van a ser MKK6 y MKK3 (Derijard y col., 1995; Raingeaud y col., 1995). Cabe resaltar que el activador MKK6 es capaz de activar todas las isoformas de p38-MAPK, no así el activador MKK3 que sólo activa la isoforma β (Enslin y col., 1998; Hale y col., 1999). Estudios *in vitro* demuestran que aunque MKK4 activa preferentemente a JNK es capaz de contribuir a la activación de p38-MAPK (Derijard y col., 1995; Doza y col., 1995; Lin y col., 1995; Brancho y col., 2003), al igual que pasa *in vivo* en algunas células inflamatorias (Moriguchi y col., 1997; Ono y Han, 2000). Recientemente se ha observado que también puede darse una activación de p38-MAPK independiente de MKKs, como la que se da en respuesta a ciertos receptores de membrana como es el caso del receptor de TNF (Ge y col., 2002; Ge y col., 2003). Otras de las activaciones independientes de MKKs descrita, es la mediada por TAB1, la cual provoca una autofosforilación de p38-MAPK capaz de activar a la proteína y con ella activar a sus sustratos (Ge y col., 2002; Tanno y col., 2003; Ohkusu-Tsukada y col., 2004).

Otro de los factores importantes a la hora de activar la ruta de p38-MAPK, es la presencia en la célula de moléculas adaptadoras capaces de acercar las proteínas quinasas para favorecer su fosforilación. Cabe destacar las proteínas JIP-2 y JIP-4 encargadas de la unión de MKK3 con varias isoformas de p38-MAPK (Schoorlemmer y Goldfarb, 2001; Schoorlemmer y Goldfarb, 2002; Morrison y Davis, 2003).

3.2. Desactivación

Las MAP quinasas fosfatasa (MKP) son un grupo de proteínas capaces de desactivar (retirar los grupos fosfato) las MAPKs, estableciendo el fin de la función que venía desempeñando (Keyse, 1995; Watanabe y col., 2001). Cabe destacar las fosfatasa específicas de serinas/treoninas como son PP2A y PP2C α (específicas de p38-MAPK) (Takekawa y col., 1998; Keyse, 2000; Tamura y col., 2002), así como la fosfatasa PP1MD con una clara implicación en cancer (Bulavin y col., 2002; Bulavin y col., 2004). Los mecanismos por los que las isoformas de p38 son reguladas de forma diferencial, dependen de los niveles de fosfatasa y también de su especificidad (Zarubin y Han, 2005).

3.3. Inhibidores farmacológicos

Se han descrito varios compuestos químicos capaces de inhibir específicamente la activación de p38-MAPK, como son SB203580, SB203590 ó SB220025, SKF86002. Uno de los más caracterizados es el SB203580, compuesto antiinflamatorio pirimidil imidazol, donde se da la interacción entre el grupo fluorofenilo del inhibidor, con la Treonina 106 de p38-MAPK impidiendo con ello que se una el ATP y con ello su activación (Wilson y col., 1997; Young y col., 1997; Evers y col., 1998; Gum y col., 1998). Este compuesto es capaz de inhibir específicamente a las isoformas α/β de p38-MAPK (Lee y col., 1994; Chatterjee y col., 1996; Cuenda y Dorow, 1998; Chen y Tan, 1998; Gum y col., 1998) pero no a p38 γ ni p38 δ (Chini y col., 1995; Cohen, 1996; Coroneos y col., 1996; Choudhury y col., 1997; Cobb, 1999; Cole, 1999). SB220025 es otro compuesto pirimidil imidazol que inhibe la fosforilación de p38 α/β siendo diez veces más potente que SB203580 (Cuenda y col., 1995; Jackson y col., 1998).

Otro de los inhibidores químicos de p38-MAPK, SKF86002, compite por el sitio de unión del ATP y es capaz de inhibir a todas las isoformas de p38-MAPK (Lee y col., 1994; Sodhi y col., 2000; Watanabe y col., 2001).

La estructura cristalina y el análisis por mutagénesis revelan que una diferencia en un único residuo entre p38 y otras MAPKs como JNK determina la especificidad de los compuestos pirimidil imidazol como SB202190 y SB203580 (Garrington y Johnson, 1999; Glogowski y col., 1999). Estos inhibidores específicos han sido ampliamente utilizados en la investigación de las funciones fisiológicas de p38 (Groom y col., 1996; Grewal y col., 1999; Goppelt-Strube y col., 2000). Aunque igual que PD98059,

SB203580 también inhibe la ciclooxigenasa-1 y -2, así como la tromboxano sintasa (Tian y col., 2000).

4. Substratos de p38-MAPK

El primer sustrato de p38 α identificado fue MAPKAP-K2(MK2), que junto con MAPKAP-K3(MK3) constituyen una pequeña familia de Serin/treonin quinasas que son fosforiladas por p38 α y/o p38 β pero no por las isoformas p38 δ y p38 γ (Freshney y col., 1994; Rouse y col., 1994; Cuenda y col., 1997). Una vez fosforilada MAPKAP-2 es capaz de fosforilar a las proteínas de choque térmico, HSP27, en diferentes serinas produciéndose tras dicha activación la disociación de las HSP27 en dímeros y monómeros y su redistribución en el citoesqueleto de actina (Huot y col., 1997). Otros sustratos de p38 con actividad MAP quinasa son MNK1/2, PRAK y MSK1/2.

La función de MNK1 y de MNK2 (*Map kinase-interacting protein kinases 1, 2*) se piensan que está relacionada con una correcta transcripción del ARN a través de la activación del factor de iniciación E1F-4E (Fukunaga y Hunter, 1997; Waskiewicz y col., 1997). PRAK (p38 regulated/activated quinasa) es una quinasa que es activada por p38 α y/o p38 β y presenta una identidad de secuencia del 20-30% con MK2 por lo que se piensa que regula HSP27 (New y col., 1998). MSK1/2 puede ser también activada directamente por p38 y ERK y de esta forma mediar la activación de CREB, factor de respuesta a AMP cíclico (Deak y col., 1998; Pierrat y col., 1998; New y col., 1999). Se ha demostrado que las MSKs están implicadas en la fosforilación de componentes relacionados en el remodelamiento de la cromatina (acetilación y fosforilación de histonas) (Zheng y col., 2003).

Se ha descrito que muchos factores de transcripción son fosforilados y consecuentemente activados por p38. AP-1 es un complejo de transcripción formado por dímeros de miembros de la familia de Jun y Fos, donde las SAPKs son las responsables de su reclutamiento, y posterior unión a los dímeros Jun-Jun, Jun-Fos o Jun-ATF fundamentalmente (Kyriakis y Avruch, 1996; Karin y col., 1997). AP-1 posee un papel importante en los procesos de inflamación y p38 es capaz de fosforilar directamente a diferentes componentes de este complejo de transcripción (Gupta y col., 1995) regulando indirectamente su actividad (Kramer y col., 1996).

5. Función de p38-MAPK

Con toda esta variedad de sustratos capaces de activarse por p38-MAPK no es de extrañar que esta familia esté implicada en diversas funciones celulares.

La participación de p38 en procesos inflamatorios fue una de las primeras funciones atribuidas a esta molécula, gracias a su implicación en la señalización de la activación de TGF- β . Se ha demostrado que en células que median procesos inflamatorios (neutrófilos, monocitos, macrófagos y células T CD4+) la activación de p38 se produce principalmente mediante dos vías: 1) Vía MKK4, en respuesta a Rac/cdc42, aunque no es susceptible de activarse en respuesta a TNF α y 2) Vía MKK6 o MKK3, donde son capaces de activarse en respuesta a TNF α y no son regulados por Rac/cdc42. El papel que desempeña p38 en procesos inflamatorios en respuesta a TNF α y IL-1 β es debido a la activación por dos de sus sustratos: AP-1 y NF- κ B (Eder, 1997). En este sentido, esta MAP quinasa tiene un papel clave durante el proceso de infiltración de los linfocitos hasta el tejido dañado.

La implicación de p38-MAPK en la regulación del ciclo celular es debida a la acción que ejerce esta proteína en los diferentes puntos de control de dicho ciclo. El control de la proliferación celular por mitógenos en células normales de mamífero en crecimiento, suele ocurrir en la transición desde el estado quiescente o G0 a la fase G1, y también durante la progresión de esta fase G1 hasta el punto de restricción R, donde las células comienzan a ser independientes de los factores de crecimiento, entrando en la fase S del ciclo celular (Ambrosino y Nebreda, 2001). El tratamiento de las células de mamífero con el inhibidor específico de p38 α/β , SB203580, retrasa la proliferación. En varias publicaciones, p38 se ha visto implicado en la progresión de la fase G1 y G2/M del ciclo celular (Molnar y col., 1997; Wang y col., 2000; Yee y col., 2004). La activación de p38 no siempre se asocia a la inducción de la proliferación celular, la parada en G1 de células NIH3T3 causada por microinyección de cdc42 se encontró que era dependiente de p38 α (Wang y col., 2000). También se ha propuesto una relación entre p38 y del control del ciclo celular en G1 a través de la regulación de HBP1 y p21, sustratos de p38 (Yee y col., 2004). HBP1 se piensa que ejerce su función mediante la represión de los genes reguladores del ciclo celular en G1 de una forma similar a la de la proteína del retinoblastoma, mientras que el inhibidor de la quinasa ciclina dependiente p21 se establece como un factor crucial en la progresión de G1 a través del bloqueo de la actividad quinasa dependiente de ciclina (CDK). La participación de p38 en la fase G2/M se ha visto en varios ejemplos; p38 α se activa en células de mamíferos en el arresto en la fase M por rotura del huso tras el uso de

nocodazol (Molnar y col., 1997). Además, se ha visto que p38 α y p38 β se requieren en el arresto en fase G2 inducida por UV (Wang y col., 1998).

Una función destacada de p38-MAPK está relacionada con la transmisión de señales como respuesta a diferentes agentes que dañan el ADN, como sería el caso de la utilización de agentes quimioteráuticos tales como el Taxol o la Vincristina (Lee y col., 1998; Deacon y col., 2003), o la exposición a diversas radiaciones como la ionizante (Verheij y col., 1998), o la ultravioleta (Raingeaud y col., 1995; Hazzalin y col., 1996; Brancho y col., 2003). Esta señalización culmina en muchos casos en un proceso de apoptosis, la cual es mediada en la mayoría de los casos por la fosforilación de p53 (Duckett y col., 1999; Huang y col., 1999; Sanchez-Prieto y col., 2000). Otra molécula implicada en el proceso apoptótico es p73, capaz de activarse por p38-MAPK en respuesta a diferentes estímulos, tales como cisplatino (Sanchez-Prieto y col., 2002).

Se ha estudiado mucho este aspecto, y parece claro que la decisión de la entrada en apoptosis en respuesta a diferentes agentes de estrés, va a venir mediada por el balance entre las rutas de ERK y p38-MAPK que será el que determinará que la célula continúe viviendo o muera (Xia y col., 1995; Berra y col., 1997; Berra y col., 1998).

Se ha descrito que la ausencia de NGF o la activación del ligando de Fas, se correlaciona con una activación de p38-MAPK y con un aumento de la apoptosis (Xia y col., 1995; Henkart, 1996; Juo y col., 1997). El uso de inhibidores de caspasas es capaz de revertir la activación de p38 en la apoptosis, sugiriendo su control sobre p38 (Cahill y col., 1996; Fernandes-Alnemri y col., 1996; Henkart, 1996; Huang y col., 1997). Sin embargo, la sobreexpresión del dominante positivo MKK6b puede también inducir la actividad caspasa y la muerte celular infiriendo que p38 puede intervenir en apoptosis tanto regulando actividad caspasa como siendo regulada por caspasas (Ziegler-Heitbrock y col., 1992; Cardone y col., 1997). El papel de p38 es muy diferente dependiendo del tipo celular y del estímulo aplicado. Mientras que la activación de p38 se ha visto que promueve la muerte celular en algunas líneas celulares, en otras aumenta la supervivencia, la proliferación, o la diferenciación (Zarubin y Han, 2005).

AGENTES INDUCTORES DE APOPTOSIS

1. Estrés oxidativo

La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés “Reactive Oxygen Species”, como el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), los peróxidos lipídicos (ROOH) o el peroxinitrito (ONOO^-) es un fenómeno inherente a todo sistema aeróbico. Se considera que entre el 1-5% del O_2 que consume la célula en condiciones normales formará H_2O_2 , aunque esta proporción puede incrementarse en situaciones anómalas (Chance y col., 1979).

Uno de los productores más importantes de ROS es la cadena respiratoria mitocondrial. La reducción incompleta del O_2 en la cadena respiratoria origina anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) que posteriormente se puede transformar en peróxido de hidrógeno. Tanto el peróxido de hidrógeno como el anión superóxido son moléculas poco reactivas, su poder nocivo reside en la posibilidad de generar radicales libres mucho más tóxicos, como el radical hidroxilo capaz de producir graves daños en multitud de biomoléculas. Se han descrito otras posibles fuentes de ROS en la célula como el retículo endoplásmico (Cross y Jones, 1991), la membrana plasmática o la membrana nuclear, así como procesos bioquímicos en los que participan ácidos grasos como el ácido araquidónico, donde gracias a acción de lipoxigenasas, se origina gran número de ROS.

Las ROS han sido relacionados con la regulación de la muerte celular en multitud de modelos. La superproducción de ROS precede a las características típicas de la muerte celular como alteraciones mitocondriales o condensación de cromatina. Estos datos junto con la protección frente a la muerte descrita por diferentes agentes antioxidantes muestran la importancia de estas moléculas en el proceso de muerte celular. Sin embargo, las ROS pueden desempeñar otras funciones fisiológicas que difieren de las relacionadas con la muerte celular, como son, (Gwinn y Vallyathan, 2006):

- Señalización celular: varias citoquinas, factores de crecimiento o neurotransmisores utilizan ROS como segundos mensajeros (Thannickal y Fanburg, 2000; Brookes y col., 2002). La capacidad de las ROS para interactuar con grupos sulfidrilos de diversas proteínas confieren a estas moléculas la posibilidad de regular la actividad de diversas enzimas que participan en importantes funciones celulares como por ejemplo proteína quinasa C, ATPasas transportadoras de Ca^{2+} , collagenasa, tirosín-quinasas o receptores de membrana (Huang y col., 1996; Kamata y Hirata,

1999). Se ha observado también que el peróxido de hidrógeno puede causar, en células endoteliales, la activación de la proteína p38. Esta proteína perteneciente a las rutas de señalización de MAP quinasas, está implicada en la regulación de la actividad de gran número de factores de transcripción (Huot y col., 1998) y múltiples procesos biológicos, entre los que se encuentra la apoptosis (Galan y col., 2000).

- Control de la transcripción: diversos factores de transcripción como NF- κ B o AP1 son sensibles a ROS (Schreck y col., 1991; Foletta y col., 1998).

- Defensa contra bacterias: los fagocitos producen ROS en defensa contra el ataque de agentes patógenos (Thomas y col., 1988).

- Control de la proliferación: se ha descrito que diferentes líneas celulares son capaces de producir ROS en respuesta a estímulos proliferativos (Burdon, 1995).

La primera evidencia que sugirió la implicación de ROS de origen mitocondrial en la muerte celular data de 1989 (Lancaster y col., 1989). Posteriormente se demostró la implicación de ROS en muerte celular por apoptosis (Pierce y col., 1991; Kane y col., 1993; Sato y col., 1995; Guenal y col., 1997; Carmody y col., 1999). Es más, muchos inductores de apoptosis son capaces de elevar la producción de ROS (Stohs y Bagchi, 1995; France-Lanord y col., 1997; Li y col., 1999b; Herrera y col., 2001). También se ha descrito que el incremento de los mecanismos de defensa antioxidantes es capaz de reducir la tasa de apoptosis en varios modelos celulares (Gorman y col., 1997; Kiningham y col., 1999). Todos estos resultados indican que la oxidación intracelular juega un papel clave en el proceso de apoptosis. Sin embargo, la producción de ROS no se puede considerar como un elemento universal de muerte apoptótica ya que se ha descrito la aparición de este tipo de muerte en condiciones donde la producción es limitada (Jacobson y Raff, 1995). Además, pretratamientos con pequeñas dosis de ROS son capaces de favorecer la proliferación celular y proteger frente a la apoptosis (del Bello y col., 1999). La producción de estas especies oxidantes no sólo ha sido relacionada con la muerte de tipo apoptótico, se cree que una masiva producción de ROS es capaz de producir una hiperperoxidación lipídica y graves alteraciones en proteínas y ácidos nucleicos lo que puede desencadenar la muerte necrótica (Aruoma y col., 1989).

2. Agentes citotóxicos

La molécula de cis-diamino-dicloroplatino o cisplatino (CDDP) fue descubierta inesperadamente en 1965 durante los estudios de la corriente eléctrica sobre *Escherichia coli* (Rosenberg y col., 1965). Este hallazgo surgió cuando realizaban una serie de experimentos con electricidad en bacterias, la división celular no se inhibió por la corriente eléctrica sino por la producción de CDDP procedentes de los electrodos de platino. Desde entonces y hasta ahora ha sido una de las moléculas más usadas en el tratamiento de diferentes tipos de tumores tales como el de cabeza y cuello, testículo, ovario, vejiga, esófago o de pulmón (Prestayko y col., 1979; Rosenberg y col., 1999; O'Dwyer y col., 2000). A pesar de la potente actividad antitumoral del cisplatino, su uso en clínica se está limitando debido al desarrollo de resistencias al fármaco y a los efectos secundarios o indeseables, como es su nefrotoxicidad. Investigaciones realizadas en este campo, indican, que aproximadamente un 20% de los casos de fallo renal agudo en pacientes hospitalizados se debe a nefrotoxicidad por cisplatino (Berns y Ford, 1997).

En las últimas décadas se ha observado un notable incremento en el número de estudios relacionados con el uso del CDDP, con la finalidad de evitar los grandes problemas que plantea su uso en clínica. También se han diseñado (Quiroga y col., 2006; Quiroga y col., 2007) y aplicado (Akaza y col., 2001; Coluccia y Natile, 2007) toda una serie de análogos del CDDP con el fin de mejorar la eficacia de la droga.

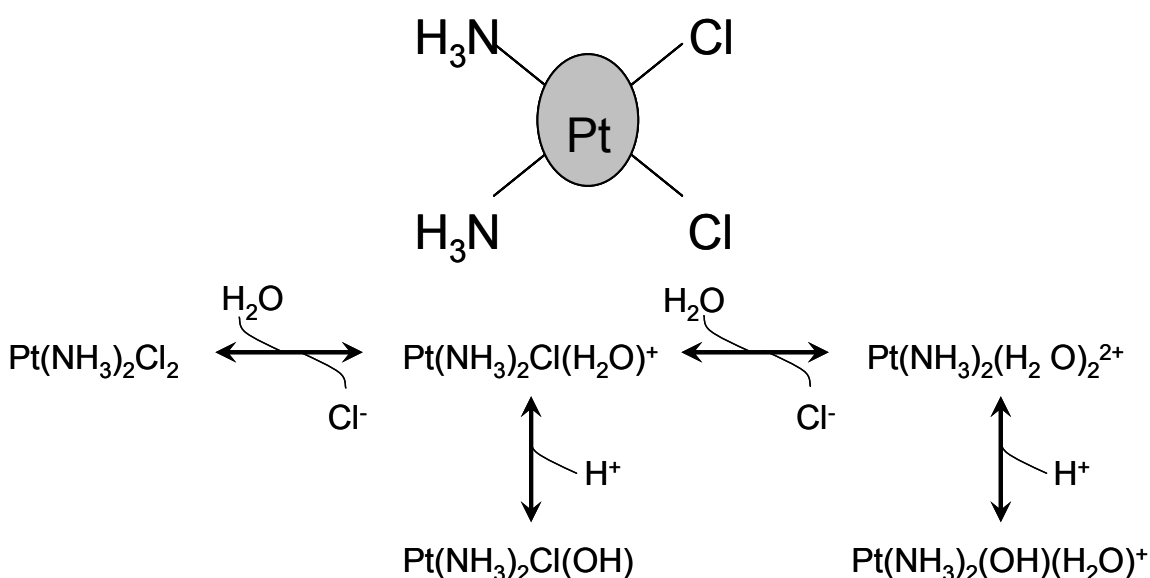


Figura 10. Representación esquemática de la molécula de cisplatino y reactividad en medio acuoso.

El CDDP es un compuesto inorgánico, neutro, formado por dos grupos cloro, dos grupos amino y una molécula de platino en el centro de la estructura. Para que el CDDP tenga una actividad tóxica en la célula es necesario que se active a través de diferentes reacciones que tiene lugar en contacto con el agua, donde se da una sustitución nucleofílica de los grupos cloro por grupos hidroxilo, liberando con ello protones. Una vez activado dentro de la célula, es un potente compuesto electrofílico capaz de unirse a grupos nucleofílicos tales como el ADN, ARN, proteínas, fosfolípidos de membrana y moléculas que contienen tiol (Gonzalez y col., 2001).

Se piensa que la entrada del CDDP a las células se da por difusión pasiva o mediante unos canales transmembranales (Gately y Howell, 1993). En el estudio de células resistentes al cisplatino donde se observaba un descenso en su acumulación, descubrieron dos proteínas de membrana que podrían estar involucradas en la entrada y en la salida respectivamente: una proteína de 48 kDa con una expresión disminuida (Bernal y col., 1990) y una proteína de 200 kDa con una expresión incrementada (Kawai y col., 1990). Ambas proteínas son distintas a las bombas de expulsión de drogas codificadas por el gen *mdr* (del inglés, *multidrug resistance*), el cual no está implicado en la resistencia a cisplatino (Deuchars y Ling, 1989). El CDDP se acumula preferentemente en las células del túbulo proximal renal (Kuhlmann y col., 1998; Arany y col., 2004; Ludwig y col., 2004), y se relacionan sus efectos secundarios nefrotóxicos con los transportadores de cationes orgánicos (OCTs) en el sistema. En humanos y en animales de laboratorio, el daño nefrotóxico inducido por cisplatino se localiza predominantemente en el segmento S3 del túbulo proximal (Dobyan y col., 1980), un segmento con unos niveles altos de expresión de transportadores de cationes orgánicos (OCTs) (Urakami y col., 2001). Los OCTs son transportadores activados por voltaje, que transportan sustratos como por ejemplo productos metabólicos o tetraetilamonio, desde la cara basolateral al citosol, antes de la secreción apical vía intercambiador protónico-catiónico (Koepsell y col., 1998; Sweet y col., 2000).

La principal acción del CDDP se da gracias a su unión con la posición N7 de las guaninas y de las adeninas, es la formación de aductos o puentes de unión entre guaninas adyacentes (*cis*-GG). Estas uniones tienen lugar entre guaninas de la misma cadena de ADN o intracatenarias, así como entre guaninas de distinta cadena de ADN o intercatenarias (Eastman y Barry, 1987; Perez, 1998). Su toxicidad se asocia mayoritariamente a uniones intracatenarias (Pinto y Lippard, 1985). En este sentido, dentro de los aductos formados en la misma cadena, un 65% corresponden a aductos *cis*-GG, y un 25% son *cis*-GA, siendo solo un 5% *cis*-GXG. Cabe destacar, que sólo un 5% del total de aductos *cis*-CG se dan entre cadenas distintas del ADN. Estos aductos

también contribuyen a la toxicidad del CDDP puesto que las enzimas encargadas de eliminarlos no son capaces de hacerlo y por tanto, polimerasas y demás enzimas encargadas de la replicación del ADN no pueden ejercer su función. Todos estos fenómenos provocan la muerte celular que mayoritariamente se da por apoptosis (Gonzalez y col., 2001).

Aunque los mecanismos responsables de la nefrotoxicidad del cisplatino no están claros, existen evidencias de la implicación de procesos de estrés oxidativo. Se ha visto un aumento en la peroxidación de lípidos de tejidos renales tras el tratamiento con cisplatino *in vivo* (Sugihara y col., 1987) y en cortes de corteza renal tratadas con cisplatino *in vitro* (Hannemann y Baumann, 1988; Brady y col., 1993). El descenso del glutathion intracelular (GSH), el cual podría actuar como quelante de radicales (Reed, 1990), potencia la citotoxicidad inducida por cisplatino (Anderson y col., 1990; Montine y Borch, 1990). Antioxidantes y quelantes de radicales previenen la peroxidación de los lípidos inducida por cisplatino y la nefrotoxicidad (Hannemann y Baumann, 1988; Baldew y col., 1989; Zunino y col., 1989; Basinger y col., 1990; Brady y col., 1990). Sin embargo, el papel de la peroxidación en la nefrotoxicidad de lípidos permanece en controversia. El descenso de la gluconeogénesis inducida por cisplatino no se ve afectada por el uso de antioxidantes y quelantes de radicales (Hannemann y Baumann, 1988; Baldew y col., 1989; Zunino y col., 1989; Basinger y col., 1990; Brady y col., 1990). La inhibición de la absorción de *p*-aminohipurato, sustancia que se elimina prácticamente en su totalidad por filtración glomerular y secreción, por CDDP tampoco está asociada con la peroxidación de lípidos en cortes de corteza renal (Inselmann y col., 1995).

La necrosis, inducida por altas concentraciones de cisplatino se asocia con efectos adversos como la bajada de los niveles de glutathion, acumulación de peróxidos, y la liberación de lactato deshidrogenada, lo cual es mejorado por el empleo de N-acetilcisteína (NAC), sugiere la implicación del estrés oxidativo en este proceso (Salahudeen y col., 1998). Lieberthal (1996) muestra que la apoptosis ocurre a concentraciones más bajas de cisplatino y es posible que preceda a la necrosis (Salahudeen y col., 1998). La implicación de la apoptosis como un importante mecanismo en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino ha ganado aceptación en los últimos años.

El arsénico es un metaloide que se sitúa en el Grupo V de la tabla periódica por su capacidad de formar iones X^{3-} . Las características de reactividad y de toxicidad de las sales de arsénico dependen de su estado de oxidación, siendo las especies trivalentes más tóxicas que las pentavalentes.

En la naturaleza, el arsénico se encuentra en muy pocas ocasiones en estado puro; se suele encontrar como óxidos, sulfuros o sales como sodio, potasio y calcio, distribuyéndose por el medio ambiente en aguas contaminadas. De hecho, la principal vía de exposición a arsénico es mediante el agua potable junto con las emisiones industriales. Entre las especies arsenicales que se encuentran en el medio ambiente, la más peligrosa es el arsénico inorgánico. La exposición a arsénico causa múltiples daños a la salud entre los que se pueden destacar enfermedades cardiovasculares, hepáticas y renales, cáncer de riñón, hígado, pulmón, vejiga urinaria y piel. Por ello, fue incluido por la IARC (*Internacional Agency for Research on Cancer*) en el grupo I de carcinógenos humanos en 1979.

A pesar de sus efectos tóxicos, el arsénico ha sido utilizado en medicina durante mucho tiempo. En la actualidad se sigue utilizando en la medicina tradicional china como remedio para enfermedades reumáticas, soriasis y sífilis. En las últimas dos décadas los compuestos arsenicales, y en particular el trióxido de arsénico, ha despertado un gran interés en la comunidad científica por su capacidad de producir una remisión total de leucemia promielocítica aguda (Chen y col., 1997; Soignet y col., 1998).

Los mecanismos por los que el arsénico actúa en células vivas no están todavía completamente entendidos. Se sabe que posterior a la entrada en la célula, el arsénico es biometilado a especies orgánicas trivalentes y pentavalentes, y que es un proceso de toxificación (Florea y Busselberg, 2006). El arsénico puede dañar a las células reemplazando a metales fisiológicos en los sitios específicos de unión a moléculas (Qian y col., 2003). También, puede actuar como catalizador en reacciones de oxidoreducción resultando en la formación de especies reactivas de oxígeno que pueden dañar el ADN, lípidos o proteínas. El arsénico por si mismo puede disparar rutas de señalización implicadas en proliferación o crecimiento celular y apoptosis (Yang y Frenkel, 2002; Qian y col., 2003). Los compuestos de arsénico inhiben las enzimas de reparación de ADN y las formas metiladas de arsénico promueven la carcinogénesis en vejiga, riñón, hígado y la glándula del tiroides (Florea y Busselberg, 2006). El arsénico inhibe las funciones biológicas de varias proteínas al reaccionar con sus grupos sulfidrilos (Goering y col., 1999).

El cadmio y otros metales pesados son contaminantes ambientales frecuentes con efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos ya conocidos. Las concentraciones de cadmio en poblaciones con alta polución están aumentando en sangre, orina, pelo y uñas. Debido a su uso extendido en baterías o agentes corrosivos están presentes en muchas cadenas alimentarias (Zimmerhackl y col., 1998). La acumulación de cadmio en el riñón provoca una disfunción del túbulo

proximal inicialmente, seguida de un daño glomerular que conduce a un daño renal crónico (Satarug y col., 2000). Los mecanismos celulares y moleculares por los que el cadmio causa nefrotoxicidad todavía no se conocen completamente. El cadmio dispara respuestas de estrés en varias cascadas de señales y pueden inducir toxicidad renal por la modificación de la actividad de factores de transcripción que son los responsables de la respuesta a estrés (Xie y Shaikh, 2006). Algunas investigaciones han descrito que el cadmio induce apoptosis en diferentes tipos celulares, incluidas células del epitelio tubular renal (Ishido y col., 1995; Hart y col., 1999; Thevenod y col., 2000), y que el estrés oxidativo contribuye a este proceso (Shaikh y col., 1999).

MECANISMOS DE DEFENSA CELULAR

1. Glutation (GSH)

Para prevenir las consecuencias nocivas del metabolismo aeróbico la célula ha ido adquiriendo evolutivamente intrincados mecanismos de destoxificación de las ROS que se producen de forma fisiológica. Estos mecanismos se pueden clasificar como sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa, glutathione reductasa, catalasa y otras proteínas con actividad peroxidasa (Sies, 1991), y sistemas no enzimáticos (glutathione reducido, vitaminas A, C, E, compuestos derivados del selenio, ácido lipóico y ubiquinonas). Existen otros sistemas enzimáticos capaces de metabolizar compuestos que generan ROS, como la glutathione-S-transferasa, glucuronosil transferasa y NAD(P)H quinona reductasa (Sies, 1991).

El glutathione (GSH) es, indudablemente, el sistema antioxidante no enzimático más importante de la célula aeróbica, encontrándose en ella en el rango milimolar. Dentro de sus funciones, cabe destacar las siguientes:

- Destoxificación de xenobióticos: Se realiza por unión directa del glutathione al agente estresante a través de una reacción catalizada por las enzimas glutathione transferasas, GSTs (glutathionilización) (Eaton y Bammler, 1999).
- Reducción de las especies o intermediarios reactivos del oxígeno: Esta reacción puede ser llevada a cabo por dos mecanismos, bien por unión directa entre GSH y ROS, o bien por una reacción catalizada por la glutathione peroxidasa (GP_x).

ENZIMA	SUSTRATO	PRODUCTOS
Catalasa	H ₂ O ₂	H ₂ O+O ₂
Superóxido dismutasa	O ₂ ^{•-}	H ₂ O ₂ + O ₂
Glutathione peroxidasa	ROOH+GSH	ROH + H ₂ O+GSSG

- Conservación de los grupos tiólicos de las proteínas: el GSH se puede oxidar formando disulfuros mixtos con las proteínas (GS-proteína), por la unión reversible a residuos cisteína o metionina mediante puentes disulfuro. Este hecho proporciona a la proteína un elemento protector frente a un daño irreversible en situaciones de intenso estrés oxidativo. Estos puentes disulfuro son eliminados por la enzima glutaredoxina (Grx) que es reducida por GSH al cesar la condición del estrés (Holmgren, 2000).

La enzima glutathion reductasa (GR) tiene un papel importantísimo en el metabolismo del GSH ya que esta es la que se encarga de reducir el glutathion oxidado (GSSG), utilizando $\text{NADPH} + \text{H}^+$ como cofactor de la reacción y donante de protones.

A pesar de ser la mitocondria el sitio principal de producción de ROS, el GSH no puede ser sintetizado en este orgánulo. Por ello el GSH ha de ser transportado a la mitocondria desde el citosol para minimizar los daños por oxidación que se producen sobre los grupos tiólicos de las proteínas, y mantener la integridad de la membrana de este orgánulo. Por ello, la eliminación del GSH que se encuentra en la mitocondria supone unos efectos altamente perjudiciales para la célula (Reed, 1990). De hecho, se ha descrito que la disminución de los niveles de GSH intramitocondrial es capaz de inhibir determinados enzimas antioxidantes, lo que conduce a la acumulación de ROS y al posterior desacoplamiento de la cadena respiratoria (Thanislass y col., 1996).

El tratamiento con butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor específico de la enzima limitante en la síntesis del GSH, γ -glutamyl-cisteína sintetasa (Griffith y Meister, 1979), causa la eliminación de este agente antioxidante, pudiendo así incrementar el efecto de diversos agentes citotóxicos (Prozialeck y Lamar, 1995; Troyano y col., 2001).

Estos datos enfatizan la importancia que tiene el glutathion dentro de los sistemas antioxidantes y de detoxificación de la célula, como modulador de la muerte celular y como defensa antioxidante frente a una excesiva acumulación de ROS.

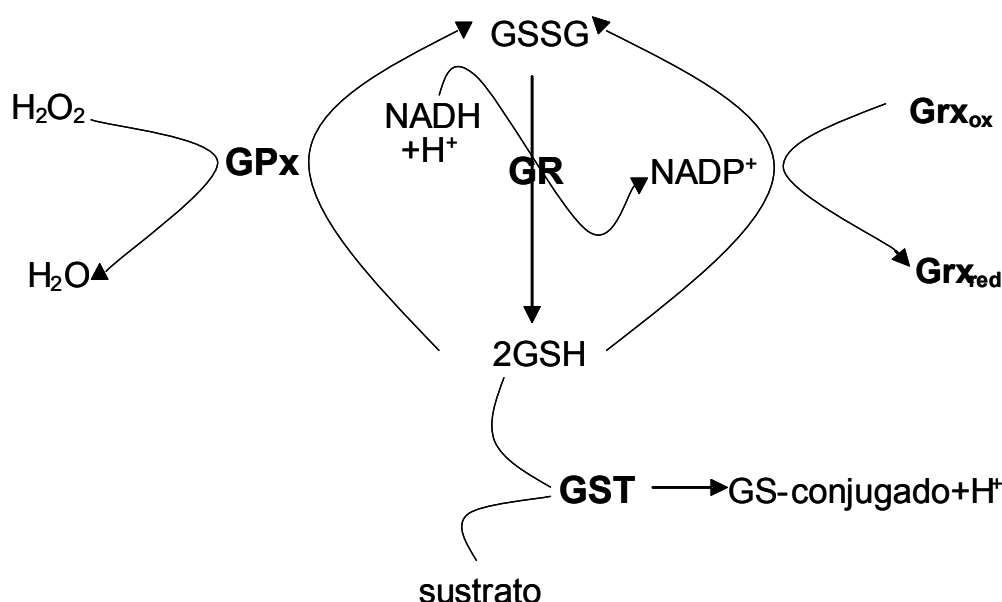


Figura 11. Representación esquemática del papel protector y ciclo de reducción del GSH.

2. Proteínas de estrés

En 1962, Ritossa observó en células de las glándulas salivales de *Drosophila melanogaster*, la mosca de la fruta, cómo el cromosoma presentaba pocos minutos después de ser sometidas a incrementos en la temperatura ambiental, engrosamientos en diferentes lugares del ADN. Estos abultamientos del ADN correspondían a la amplificación de genes que codificaban proteínas que fueron posteriormente identificadas por Tissières como proteínas choque térmico (Schedl y col., 1978). Más tarde se observó que otros estímulos como los metales pesados, hipoxia, estrés oxidativo o daños en el DNA podían tener el mismo efecto. Por esta razón es más apropiado denominarlas “proteínas de estrés”.

Todos los organismos vivos expresan algunos de los miembros que componen esta familia de proteínas bajo condiciones normales. La estabilidad y el transporte de proteínas en el interior celular es la función principal de esta familia, por lo que constituyen las chaperonas por excelencia (Ellis, 1987).

Las proteínas de choque térmico (HSP) son producidas por células expuestas a estrés biológico como calor o agentes químicos (Shimada y col., 1998). Las HSPs se clasifican en grupos en función de su peso molecular:

- HSPs de alto peso molecular donde nos encontramos la familia Hsp90, Hsp70 y Hsp60 (Welch, 1991). Actúan como chaperonas en el plegamiento, oligomerización y translocación (Benjamin y McMillan, 1998). La proteína Hsp70 se suele expresar a muy bajo nivel en situaciones normales, induciéndose fuertemente en respuesta al estrés
- HSPs de bajo peso molecular: las cuales tienen masas moleculares desde 10 a 30 kDa. Aunque las funciones de Hsp27 y α B-cristalina, no están tan bien caracterizadas como las HSP de alto peso molecular, se piensa que podrían tener también funciones de chaperonas (Benjamin y McMillan, 1998). La actividad de Hsp27 está regulada por modificaciones post-transcripcionales como la fosforilación (Welch, 1985; Benjamin y McMillan, 1998). También se ha descrito que la forma fosforilada de Hsp27 se transloca desde citosol al núcleo en células progenitoras del hipocampo, y previene la apoptosis (Geum y col., 2002).

Se ha descrito la estimulación de la expresión de Hsp70 en asociación con la apoptosis inducida por butirato y choque térmico en células BL-30 de linfoma de Burkitt (Filippovich y col., 1994). Por otro lado, existen trabajos que describen variaciones a lo

largo del ciclo celular de la forma inducible HSP70 que estaría implicada en la apoptosis inducida por calor en células HL-60 (He y Fox, 1997).

El mecanismo por el cual Hsp70 protege de la apoptosis, empezó a ser vislumbrado en fibroblastos Rat-1 (Gabai y col., 2000). En estas células, Hsp70 protege de la apoptosis inducida por calor afectando la actividad de la MAP quinasa JNK, un componente temprano de la ruta apoptótica. Se ha visto que Hsp70 reduce el periodo de activación de la quinasa acelerando la desfosforilación de JNK.

Recientemente se ha visto que Hsp70 previene la activación de caspasa 3, rotura de PARP, aparición de ADN fragmentado y, finalmente, la muerte celular apoptótica en células U-937 (Li y col., 2000). Se ha sugerido que Hsp70 inhibe la apoptosis a través de su función chaperona, aunque no se puede excluir la posibilidad de que Hsp70 actúe como cofactor. Hsp70 inhibe la apoptosis actuando después de la liberación del citocromo c y antes de la activación de la caspasa 3 (Li y col., 2000).

Estudios realizados muestran que Hsp70 puede ser inducida en células del túbulo renal en diversas condiciones de estrés, sugiriendo una función citoprotectiva, las principales HSPs se localizan principalmente en el epitelio tubular del riñón. Recientes estudios *in vivo* muestran que pueden estar inducidas en células dañadas en modelos animales de fallo renal agudo debido a isquemia y drogas nefrotóxicas (Wakui y col., 1995).

También existe la posibilidad de que otras HSPs, que pueden tener papeles citoprotectivos se indujesen en los mencionados modelos. Por ejemplo, (Mehlen y col., 1993) encontraron que la expresión transitoria de Hsp27 en un modelo celular de mono (células COS) aumenta la resistencia al calor y al H₂O₂. Hsp27 regula la apoptosis a través de su capacidad para interaccionar con los componentes principales de las rutas de señalización apoptóticas (Concannon y col., 2003). Hsp27 podría mantener la estabilidad mitocondrial en la célula, así como el estado redox. Incrementos en la expresión de Hsp27 durante la respuesta al estrés celular se correlacionaría con una mejor supervivencia al estrés citotóxico. (Arya y col., 2007).

LINEAS CELULARES DE TÚBULO RENAL PROXIMAL

La unidad funcional del riñón de mamíferos es la nefrona, la nefrona puede dividirse en tres regiones principales: la nefrona proximal, el asa de Henle y la nefrona distal. La nefrona proximal consta de la cápsula de Bowman, que rodea al glomérulo, y el túbulo proximal. La horquilla del asa de Henle comprende una rama descendente y una rama ascendente. Esta última acaba en el túbulo distal, el cual se une a un conducto colector que sirve para varias nefronas. En cada región nos encontramos distintos tipos celulares cumpliendo una función específica.

En el túbulo proximal se inicia el proceso de concentración del filtrado glomerular compuesto por agua y solutos no proteicos (cristaloides como Na^+ , K^+ , Cl^- , glucosa y urea) en proporciones aproximadas a las que hay en plasma. Cerca del 75% del filtrado se reabsorbe antes de que llegue al asa de Henle. El túbulo proximal está diseñado especialmente para la reabsorción masiva de sal y agua, son células ricas en mitocondrias y los numerosos microvilli en el lado luminal de las células del epitelio tubular forman el denominado borde en cepillo. Además de su actividad reabsorbente, las células del túbulo proximal secretan activamente diversas sustancias al interior de la luz tubular. De este modo se eliminan numerosos metabolitos de la sangre, incluyendo sales biliares, creatinina, hipuratos, prostaglandinas y urato. Además, el riñón también elimina numerosas sustancias mediante secreción, incluyendo fármacos como la penicilina, la quinina y los salicilatos (aspirina). Existen dos sistemas de transporte de baja especificidad, uno para los aniones como el amino hipurato y otro para los cationes como la creatinina. Al igual que ocurre con el transporte de aminoácidos y de glucosa desde la luz hacia el interior de las células tubulares, estos sistemas de transporte pueden quedar saturados.

Las células tubulares proximales son las más vulnerables a las sustancias tóxicas de la sangre, debido a su intensa exposición al filtrarse por el glomérulo, a los sistemas enzimáticos que activan los tóxicos y al transporte selectivo de sustancias tóxicas

La presencia de células apoptóticas se ha demostrado en varias enfermedades renales. Sin embargo, existen numerosas preguntas sin respuesta acerca del papel preciso de la apoptosis en el daño renal y los factores extra e intracelulares que inducen y previenen este proceso en el riñón. La apoptosis provocada por isquemia, toxinas exógenas, o mediadores endógenos de daño, podrían ser la causa que desencadenara la enfermedad renal. La progresión de la enfermedad renal, podría ser consecuencia de la persistencia de una tasa alta de apoptosis de las células

parenquimales que conducen a la atrofia tubular y glomerular. Alternativamente, una baja tasa de apoptosis puede promover la fibrosis renal (Ortiz y col., 1996).

Apoptosis y necrosis de células tubulares ha sido observada durante isquemia, intoxicaciones y fallo renal agudo obstructivo (Gobe y Axelsen, 1987; Ledda-Columbano y col., 1989; Gobe y col., 1990; Schumer y col., 1992; Shimizu y Yamanaka, 1993; Nouwen y col., 1994). No está clara la contribución relativa de los dos tipos de muerte a la pérdida inicial de células. La apoptosis podría ocurrir en células proliferativas en un proceso compensatorio después del daño renal. Estas células podrían ser más sensibles al déficit absoluto o relativo de factores de supervivencia. En este sentido podría contribuir a la persistencia de una recuperación retrasada después del fallo renal agudo, pero también la apoptosis podría contribuir a una adecuada resolución del daño (Ledda-Columbano y col., 1989; Shimizu y Yamanaka, 1993; Nouwen y col., 1994). En este último caso podría representar un balance fisiológico para controlar una respuesta compensatoria exagerada después del daño. De hecho se ha observado un segundo pico de apoptosis cuando los túbulos necróticos han sido completamente reconstituidos por un epitelio hiperplásico (Shimizu y Yamanaka, 1993).

Comprender el papel y la regulación de la apoptosis en las enfermedades renales puede mejorar nuestro conocimiento del modo de acción de terapias en progreso, y esto podría también procurarnos las bases para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. Estas nuevas terapias pueden incluir drogas que interfieren con el desarrollo de la apoptosis, estrategias antisentido y antagonistas de citoquinas o mediadores lipídicos. Aunque las precisas y potenciales dianas genéticas de las terapias moduladoras de la apoptosis todavía tienen que ser definidas.

OBJETIVOS

Se pretende aportar nuevos datos sobre la forma en que agentes citotóxicos desencadenan el proceso de apoptosis en células renales, con la pretensión de reducir su efecto nefrotóxico. Los agentes utilizados en nuestros estudios, son aquellos que tienen una mayor incidencia en este tipo celular.

Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Establecer el modelo de células renales quiescentes.
2. Analizar la implicación de distintas MAPKs en el proceso de apoptosis inducido por distintos agentes nefrotóxicos.
3. Comprobar la implicación de p38-MAPK en la apoptosis inducida por cisplatino en distintas líneas de túbulo proximal y distal.
4. Investigar cómo influye el estado celular en el papel de p38-MAPK.
5. Estudiar los mecanismos por los que p38-MAPK regula la apoptosis en este modelo celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

MATERIAL BIOLÓGICO

1. Líneas celulares

Esta tesis se ha realizado en su mayoría, utilizando como modelo celular la línea NRK-52E de carácter epitelial renal que fue clonada a partir del mismo cultivo mixto de células normales de riñón de rata del que se obtuvo la línea NRK-49F, con características de fibroblastos (de Larco y Todaro, 1978).

Otras líneas celulares utilizadas:

- a) Células LLC-PK1: epitelio tubular renal de cerdo (Hull y col., 1976).
- b) Células MDCK: epitelio tubular renal de perro (Gaush y col., 1966).
- c) Células HK-2 epitelio tubular proximal humano (Ryan y col., 1994).

En algunas ocasiones se ha empleado la línea celular humana U-937. Esta línea, de naturaleza promonocítica, fue establecida por Sundström y Nilsson a partir de un paciente con linfoma histiocítico difuso (Sundstrom y Nilsson, 1976).

2. Condiciones de cultivo celular

En el cultivo y propagación de las líneas NRK-52E, LLC-PK1 y MDCK se utilizó el medio D-MEM bajo en glucosa (1000 mg/L) (Gibco BRL). En el cultivo de la línea HK-2 se empleó D-MEM/F-12 (1:1) sin glutamina (Gibco BRL) y además se suplementó el medio con Insulin-Tranferrin-Selenium-X (Gibco BRL). Por último, en el caso de la línea celular humana U-937 se empleó el medio RPMI-1640 (Life Technologies, Inc.).

A los medios de cultivo se añadieron los siguientes compuestos, a las concentraciones finales indicadas:

Glutamina (Gibco BRL)	2 mM
Penicilina-Estreptomicina (Gibco BRL)	100 IU/ml
Suero fetal bovino (FBS) descomplementado	5%(v/v)

El suero fetal bovino se descomplementó por calentamiento a 56°C durante 30 minutos.

Los cultivos fueron realizados en una estufa termostatzada a 37°C, en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Las líneas de túbulo renal se mantuvieron mediante 2 pases por semana tripsinizándolas durante 5 minutos a 37°C.

MATERIAL NO BIOLÓGICO

1. Agentes y tratamientos celulares

Se han utilizado agentes y tratamientos inductores y/o moduladores de la muerte celular, que se detallan a continuación. Agentes:

-Butilhidroxianisol (BHA). Se restituyó en etanol absoluto a una concentración de 500 mM conservándose a -20°C. Se utilizó a una concentración final de 200 μ M.

-Catalasa: Sigma. Concentración del stock comercial 113500 U/ml, que se conservó a 4°C. Se utilizó a una concentración final de 500 U/ml.

-Cisplatino (CDDP): Sigma. P.m.: 333,0. Se disolvió en agua a una concentración stock de 3,3 mM. Este stock se mantuvo a 4°C protegido de la luz no más de 2 semanas.

-Cloruro de Cadmio (CdCl_2): Sigma. P.m.:189,39. El stock se preparó en agua a una concentración de 100 mM y fue almacenado a 4°C.

-L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO): Sigma. P.m.: 222,3. Inmediatamente antes de su uso, se disolvió en agua a una concentración stock de 50 mM. La concentración a la que fue utilizado es de 1 mM.

-PD98059: Calbiochem. P.m.: 267,3. Se disuelve en DMSO hasta una concentración de 20mM conservándose a -20°C. La concentración final durante los tratamientos es de 40 μ M.

-SB203580: Calbiochem. P.m. 377,4. El stock se diluye en DMSO hasta una concentración final de 13,2mM conservado a -20°C. La concentración de uso es de 15 μ M.

-SB220025: Calbiochem. P.m. 338,4. El stock se diluye en DMSO hasta una concentración de 20mM, conservándose en oscuridad a -20°C. La concentración de uso fue de 2 μ M.

-SP600126: Calbiochem. P.m. 220,2. Se diluye hasta una concentración stock de 20mM en DMSO y se conserva a -20°C, protegido de la luz. La concentración de uso es 20 μ M.

-Trióxido de arsénico (As_2O_3): Sigma. P.m.: 197,84. El stock se prepara en una solución básica de agua destilada a una concentración de 100mM y conservado a 4°C.

-U126: Calbiochem. P.m.:380,5. El stock del producto es de 2,63 mM en DMSO y conservado a -20°C. La concentración de uso es 10 µM.

-Z-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona (Z-VAD-fmk): Calbiochem. P.m.: 467,5. El stock se disolvió en DMSO a una concentración de 20mM y se almacenó a -70°C. Se utilizó a una concentración final de 40µM.

Todos los agentes disueltos en agua, fueron posteriormente esterilizados mediante filtración utilizando filtros de 0,22µm (GSW PO2500, Millipore) antes de la adición al cultivo.

2. Material fotográfico.

En las exposiciones fotográficas se utilizaron películas X-OMAT AR (Kodak) y AGFA Curix RP2 Plus, que fueron reveladas en un aparato AGFA Curix 60, que utiliza revelador G-153 y fijador G-354.

En la composición de figuras se empleó un escáner HP Scanjet 4070 Photosmart y como programas de edición de imágenes Corel Draw v.12 y Microsoft Power Point 2000.

MÉTODOS

ANÁLISIS DE PARÁMETROS CELULARES

1. Cuantificación de células apoptóticas

1.1. Por microscopía de fluorescencia (Vergne, 1987)

Procedimiento:

- Las células se siembran en cámaras portaobjetos, Lab-Tek® Chamber Slide™, y se realiza el tratamiento correspondiente.
- Se retira la cámara y se dejan las células secar al aire.
- Se fijan las células en etanol al 70% (v/v) a temperatura ambiente durante 20 minutos y se dejan secar los portas.
- La tinción del ADN se realiza sumergiendo los portaobjetos en una solución de PBS que contiene 1µg/ml de DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol; Serva (Heidelberg, Alemania)) durante 20 minutos en oscuridad, que tiñe el ADN.
- Tras dejar secar en oscuridad, las preparaciones se montan añadiendo una gota de medio de montaje (10% (v/v) PBS, 0,1% (p/v) de o-fenilendiamina, 90% (v/v) glicerol) y colocando el cubreobjetos encima.
- Las preparaciones se pueden conservar a -20°C y protegidas de la luz hasta su observación por microscopia de fluorescencia, viéndose las células apoptóticas con el ADN condensado y fragmentado en múltiples cuerpos apoptóticos.

1.2. Por citometría de flujo (Crissman y Steinkamp, 1973)

Se pueden detectar las células apoptóticas cuantificando su contenido ADN teñido con un agente intercalante como ioduro de propidio. Estas células tienen su ADN condensado y fragmentado, lo que les hace incorporar menos cantidad de ioduro de propidio.

La fluorescencia emitida por este compuesto fue detectada por un citómetro de flujo EPICS-XL Coulter (Florida, USA) que opera a 200 mW, usando una longitud de onda de excitación de 488 nm emitida por un láser de argón, y un filtro con pico de emisión de 590nm.

Procedimiento:

- Después de tripsinizar, se recogen las células contenidas en cada pocillo de una placa de cultivo de 6. Tras su centrifugación a 1000 r.p.m. se lavan con PBS 1X.
- El sedimento celular obtenido, se resuspende en 425 μ l de PBS, 50 μ l de NP-40 10% (concentración final: 1% (v/v) en PBS) y 3 μ l de RNasa A 10 mg/ml (0,5 mg/ml final) y se incuban a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- Después se añaden 25 μ l de ioduro de propidio 1 mg/ml (50 μ g/ml final) y se analiza por citometría de flujo la intensidad de fluorescencia que emiten, considerando apoptóticas las células con contenido en ADN hipodiploide (pico sub-G₁).

1.3. Por colorimetría(APOPercentage™)*

La translocación de fosfatidilserina a la superficie de la membrana citoplasmática se ha vinculado con el inicio de la fase de ejecución de la apoptosis. El desplazamiento de fosfatidilserina mediante “*flip-flop*”, permite la entrada del colorante APOPercentage Dye hasta su saturación, entonces, ya no se produce desplazamiento alguno a través de la membrana. Las células viables no dejan entrar el colorante y las necróticas son incapaces de retenerlo.

*APOPercentage kit (Biocolor Ltd., Newtownabbey, Ireland, United Kingdom).

Procedimiento:

- Los tratamientos celulares se realizan en placas de 24 pocillos.
- Luego se sustituye el medio de incubación por 360 μ l de medio de cultivo fresco, y se añaden 20 μ l de APOPercentage Dye.
- Se incuba 30 minutos a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.
- Después de retirar la mezcla con cuidado, se hacen dos lavados con 200 μ l de PBS para eliminar el APOPercentage Dye no introducido en la célula.
- Para realizar la cuantificación colorimétrica, se añaden 100 μ l de APOPercentage Dye release reagent y se agita suavemente la placa durante 10 minutos.
- El reactivo recuperado es cuantificado en un lector de placas ASYSHitech GmbH (Austria) a una λ de 550 nm.

2. Valoración de peróxido de hidrógeno celular

La producción de peróxido de hidrógeno se puede cuantificar mediante el uso de la sonda fluorescente diacetato de diclorofluoresceína ($H_2DCF-DA$). Esta sonda, permeable a la membrana plasmática, se acumula en las regiones lipídicas hidrofóbicas donde es hidrolizada por esterasas celulares, quedando retenida en la célula como diclorofluoresceína reducida (H_2DCF), y al reaccionar con peróxidos produce diclorofluoresceína oxidada (DCF) fluorescente (Bass y col., 1983).

Procedimiento:

- Después de tripsinizar, se recogen las células contenidas en cada pocillo de una placa de 12.
- Las células se centrifugan a 1000 r.p.m y resuspenden en 1ml de RPMI sin rojo fenol.
- Se añade la sonda $H_2DCF-DA$ (Sigma) a una concentración de 5 μM (1 μl de la solución stock de 5 mM) y se incuban durante una hora a 37°C.
- La medida de la fluorescencia se realizará 30 minutos después por citometría de flujo utilizando un filtro de 525 nm.

3. Medida del potencial de membrana mitocondrial

La mitocondria genera un fuerte gradiente de carga negativa en su interior gracias a la cadena respiratoria que extrae protones de la matriz mitocondrial, generando lo que se denomina potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Este gradiente es utilizado por la ATPasa mitocondrial en la síntesis de ATP, ayudada por el flujo de protones a favor de gradiente que entran en la matriz.

Las sondas que se emplean en el estudio de $\Delta\psi_m$ son sustancias catiónicas hidrófobas, por lo que se acumulan preferentemente en la mitocondria. Esta acumulación depende del potencial de membrana mitocondrial, a favor de gradiente de la carga negativa (Petit y col., 1990). En este trabajo se probó la sonda rodamina 123 (R123).

Procedimiento:

- Se siembran las células en placas de 6 pocillos. Una vez realizado el experimento se recogen por tripsinización.

- Las células se centrifugan a 1000 r.p.m., luego el sedimento se resuspende en PBS 1X con 1µg/ml de R123 y se incuban durante 20-30 minutos en oscuridad a 37°C.
- Para eliminar el APOPercentage Dye no introducido en las células, se lavan con PBS 1X y se mide la fluorescencia por citometría de flujo con un filtro de 525 nm.

4. Valoración de actividad caspasa

Procedimiento para extraer proteínas:

- Se recogen las células contenidas en una Placa Petri de 60mm de diámetro mediante raspado. Se centrifugan a 1000 r.p.m., y se lavan en PBS 1X.
- Las células se resuspenden en 50µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,03% (v/v) de NP-40, 1mM de DTT) y se dejan 30 minutos a 4°C.
- El lisado celular se centrifuga a 13.800 g, durante 15 minutos a 4°C.
- Se recoge el sobrenadante y, tras ser valorado mediante el uso del reactivo BioRad *Protein Assay Reagent*, se conserva a -80°C hasta su uso.

Procedimiento para medir la actividad de caspasa:

- En placas de 96 pocillos se aplican alícuotas con la misma cantidad de proteína (30µg) y se añade el sustrato de caspasa correspondiente a una concentración final de 200µM, completando después hasta 200µl con PBS.
- Después de incubar a 37°C en oscuridad durante una hora, se midió la absorbancia de cada pocillo a 405 nm.

El sustrato de caspasa (*caspase-3 substrate I, colorimetric Ac-DEVD-pNA*) de la marca Calbiochem se solubilizó en DMSO a una concentración de 5mM y se conservó, protegido de la luz, a -20°C.

5. Determinación de glutation celular (Fernandez-Checa y Kaplowitz, 1990)

En esta valoración se utiliza la sonda monoclorobimane (Molecular Probes) que interacciona específicamente con este compuesto. Esta sonda adquiere fluorescencia tras su conjugación con los grupos tiólicos (preferentemente GSH), por lo que es fácilmente detectable.

Procedimiento:

- Las células se siembran en placas Petri de 10 cm de diámetro, se recogen con la ayuda de un rascador de placas, y tras su centrifugación a 1000 r.p.m. se lavan en PBS 1X.
- Después de resuspender las células en 400µl de PBS 1X con la sonda, a una concentración final de 2mM, se incuban en oscuridad a 37°C durante 20 minutos.
- Se retira el exceso de sonda mediante lavado, resuspendiendo las células, después, en PBS 1X.
- La fluorescencia de las muestras se mide en un lector PolarStar Galaxy Fluoremeter (BMG Lab Technologies) a una λ de excitación de 390 nm y de emisión de 520 nm, utilizando placas de 96 pocillos de fondo plano donde las muestras se reparten entre cuatro pocillos.
- Los resultados obtenidos son normalizados con la cantidad de proteína de cada muestra.

6. Análisis de platino celular por TXRF (Total-reflection X-Ray Fluorescente)

El análisis por TXRF se realizó usando un espectrofotómetro Seifert Extra-II (Seifert, Ahrensburg, Germany). Las determinaciones de TXRF se llevaron a cabo de acuerdo al procedimiento descrito en la bibliografía (Quiroga y col., 2006).

Procedimiento:

- Una muestra de 100µl de la suspensión celular o de ADN se introduce en un tubo prueba de 2ml.
- Esta solución se estandariza con 100 ng/ml de vanadio (Merck, ICP solución estándar de vanadio).
- A continuación la muestra se introduce en un concentrador de flujo de nitrógeno de alta pureza a una temperatura de 70°C hasta que el volumen se reduce 5 veces.
- Se toma una alícuota de 5 µl y se deposita en un reflector de cuarzo y se seca sobre un soporte de cerámica a una temperatura de 50°C. El proceso entero se realiza en una cabina de flujo (Model A-100).
- Las muestras se analizan utilizando la línea de Rayos X del molibdeno bajo unas condiciones de trabajo de 50 KV y 20 mA. Los espectros son grabados entre 0-20KeV. Se analizan simultáneamente los siguientes elementos: P, S,

K, Ca, V, Fe, Cu, Zn, As, Br, Rb, Sr, Ni, Mn, y Pt, para obtener una perfecta deconvolución de ficheros asociados con el espectro general. La línea de Pt se usa para la cuantificación de Pt.

6.1. Determinación de cisplatino intracelular

Procedimiento:

- Se siembran las células en placas Petri de 10 cm de diámetro. Después de realizar el experimento correspondiente se recogen las células con un rascador de placas y se lavan en PBS 1X.
- Las células son resuspendidas en 400µl de PBS
- Alícuotas celulares de 50µl se diluyen en agua destilada con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno (<1% v/v) hasta un volumen final de 500µl.
- La determinación de platino contenido en la muestra se analiza por TXRF (apartado 6) y es referido a la cantidad de células que corresponde.

6.2. Determinación de cisplatino unido a ADN

Procedimiento:

- Se siembran las células en placas Petri de 60mm de diámetro. Tras la finalización del tratamiento se recogen las células con un rascador de placas, se centrifugan a 1000 r.p.m., y se lavan con PBS 1X.
- El ADN se extrae siguiendo las instrucciones del QIAamp Mini Kit (Qiagen GMBH, Hilden, Germany) eluyendo con 150 µl de tampón AE.
- La cantidad de cisplatino es cuantificado por TXRF (apartado 6) y es referida a su contenido en ADN determinado en un Thermo Scientific NanoDrop™ 1000.

PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

1. Preparación de proteínas

1.1. Obtención de extractos proteicos totales

Procedimiento:

- Se recogen mediante raspado las células contenidas en una Placa Petri de 60 mm de diámetro.
- Se centrifugan a 1000 r.p.m y se lavan en PBS 1X. El sedimento celular se resuspende en 75µl de tampón (Tris-HCl 20 mM, pH=7,5, MgSO₄ 5mM, EGTA 0.5mM, 1% (v/v) de cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma), 1% (v/v) β-mercaptoetanol, y los inhibidores de fosfatasas NaF (10 µM) y ortovanadato sódico (1 µM).
- Las muestras se sonicán durante 2 ciclos de 20 segundos en hielo en un sonicador Branson Digital Sonifier 450™ a una amplitud del 10%. Los extractos totales obtenidos se pueden almacenar a -20°C hasta su uso.

1.2. Obtención de extractos proteicos citosólicos

Procedimiento:

- Se recogen mediante raspado las células contenidas en una Placa Petri de 10cm de diámetro. Se centrifugan a 1000 r.p.m., tras lo cual se lavan en PBS 1X y se vuelven a centrifugar.
- Para llevar a cabo la lisis, se añaden 100µl de tampón de lisis, que contiene: KCl 80mM, sacarosa 250 mM, digitonina 350µg/ml (Calbiochem) y 1% (v/v) de cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma).
- Las muestras se incuban 5 minutos en hielo y posteriormente se centrifugan a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Los sobrenadantes corresponden a las fracciones citosólicas.

1.3. Valoración de proteínas

La concentración de las muestras se valora utilizando el reactivo BioRad *Protein Assay Reagent*.

2. Análisis de proteínas por (“Western” blot)

Procedimiento:

- La misma cantidad de proteína por pocillo, se separa por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (BioRad) según el método de (Laemmli, 1970), por el sistema de separación electroforética Mini-Protean (BioRad).
- Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Inmobilon™-P, Millipore) por el sistema de transferencia Mini-Protean (BioRad) durante 1 hora a 100V.
- La membrana fue bloqueada con T-TBS (0,05%(v/v) Tween-20, Tris 25mM, NaCl 150 mM, pH=7,5) con un 1% de albúmina de suero bovino (Roche) o un 4% de leche desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente.
- La membrana con el anticuerpo primario se incubó toda la noche, a 4°C y en agitación, en la solución de bloqueo y luego se someten a tres lavados en T-TBS de 10 minutos.
- Después se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, y diluido en la solución de bloqueo.
- Tras otra serie de lavados las membranas se revelan con el kit comercial ECL (Enhanced Chemiluminescence Western Blotting Detection System RNP2019, Amersham) en las condiciones recomendadas por el fabricante.

3. Relación de anticuerpos utilizados

• Primarios

Proteína	Origen	Dilución	Casa Comercial
p44/p42 ERK humana	conejo	1:1000	Cell Signaling
Fosfo-p44/p42 humana (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)	conejo	1:1000	Cell Signaling
p38 humana	conejo	1:1000	Cell Signaling
Fosfo-p38 humana (Thr ¹⁸⁰ /Tyr ¹⁸²)	conejo	1:1000	Cell Signaling
SAP/JNK humana	conejo	1:1000	Cell Signaling

Proteína	Origen	Dilución	Casa Comercial
Fosfo-JNK (Thr ¹⁸³ /Tyr ¹⁸⁵) humana	conejo	1:1000	Promega
Bax (N-20) humana	conejo	1:2000	Santa Cruz Biotech.
Bcl-X _L humana	conejo	1:1000	Transduction Laboratories
Bid (C-20) humana	cabra	1:1000	Santa Cruz Biotech.
Citocromo c paloma	ratón	1:750	BD Pharmigen
Clon 7HB.2C12			
Hsp27 humana	ratón	1:2000	StressGen Biotech.
Hsp60 (K-19) humana	cabra	1:1000	Santa Cruz Biotech.
Hsp70 humana	ratón	1:1000	StressGen Biotech.
Clon C92F3A-5			
PKC- δ humana	conejo	1:1000	Santa Cruz Biotech.
p53 DO-1	conejo	1:1000	BD Pharmigen
Fosfo-Ser ¹⁵ -p53	conejo	1:1000	Cell Signaling
α -antitubulina	ratón	1:10000	Sigma

- **Secundarios**

Los anticuerpos secundarios utilizados, como se ha mencionado anteriormente, son anticuerpos conjugados con peroxidasa:

- Frente a anticuerpos de ratón: "horseradish peroxidase-conjugated rabbit antimouse IgG" (Dako Diagnósticos, Barcelona). Se empleó a una dilución 1:5000.
- Frente a anticuerpos de conejo: "horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG" (Dako Diagnósticos, Barcelona). Se utilizó a una dilución 1:5000.

Frente a anticuerpos de cabra: ECL Rat IgG, HRP-Linked (Amersham Bioscience, Barcelona). Se utilizó a una dilución 1:5000.

TRANSFECCIONES CON VECTORES DE EXPRESIÓN

1. Preparación y análisis de los plásmidos

Se crecen bacterias *Escherichia coli* (cepa DH5 α), portadoras del plásmido recombinante, en medio selectivo (LB+Ampicilina). A continuación, se aísla el ADN plasmídico siguiendo las instrucciones del sistema comercial QIAGEN Plasmid Mega Kit (Qiagen GMBH, Hilden, Germany). Se cuantifica el ADN por espectrofotometría y se verifica su identidad por minigeles de agarosa.

2. Transfecciones transitorias

Las células NRK-52E fueron transfectadas con los plásmidos de expresión: pCDNA3-flag (MKK6-Ala), pCDNA3-flag (MKK6-Glu) o pEGF-c1 (GFP). El dominante negativo MKK6-Ala tiene sustituida la Lys-82 por una Ala, lo cual produce una forma inactiva. De forma similar, MKK6-Glu tiene sustituida la Ser-207 y la Thr-211 por Glu, funcionando como un sustrato endógeno constitutivamente activo para fosforilar quinasas como p38- MAPK (Rangaud, Whitmarsh et al. 1996).

Las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos hasta que llegan a un estado de confluencia, momento en que son transfectadas con la ayuda de liposomas catiónicos (Lipofectamina 2000 de Invitrogen) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Procedimiento:

- Las células se lavan dos veces con PBS 1X, se añaden 0,5 ml de OptiMEM (Gibco-BRL) en cada pocillo y se cultivan a 37°C durante 30 minutos.
- Se prepara una solución formada por 0,75 μ g de ADN plasmídico y 50 μ l de OptiMEM, y otra formada por 2 μ l de lipofectamina y 50 μ l de OptiMEM, se incuban 5 minutos a temperatura ambiente.
- Las dos soluciones preparadas, con el ADN y la lipofectamina, se mezclan e incuban 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se añade a las células y se incuban a 37°C durante 6h. Después se retira el medio, se lavan las células con PBS 1X y se añaden 0,5 ml de medio de cultivo.
- Al cabo de 24 h se sustituye el medio de cultivo completo por DMEM sin suero y se ponen los tratamientos.

- A las 24 h de tratamiento se cuantifican las células apoptóticas de cada pocillo por la técnica colorimétrica APOPercentage™.
- La absorbancia se mide a una λ de 550 nm en un lector de placas ASYSHitech GmbH (Austria).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado, los datos se representan como media \pm SD.

Las diferencias de significación entre condiciones experimentales fueron examinadas en algunos casos usando el test estadístico “t-Students”. Los niveles de significación se indican mediante asteriscos: (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

RESULTADOS

1. Modelo experimental

Para obtener una población de células sincronizadas y quiescentes similar al epitelio proximal de túbulo renal, tomamos como referencia las condiciones propuestas por Stinson (2003). Las células de túbulo renal distal NRK-52E se cultivaron hasta llegar a confluencia, a continuación se mantuvieron 3 días con medio completo, y finalmente 16 horas con medio sin suero antes de aplicar los tratamientos (Figura 1A). La caracterización de células proliferantes o quiescentes se realizó por citometría de flujo, identificando cada etapa del ciclo celular según su contenido en ADN mediante teñido con yoduro de propidio (IP) (Figura 1B).

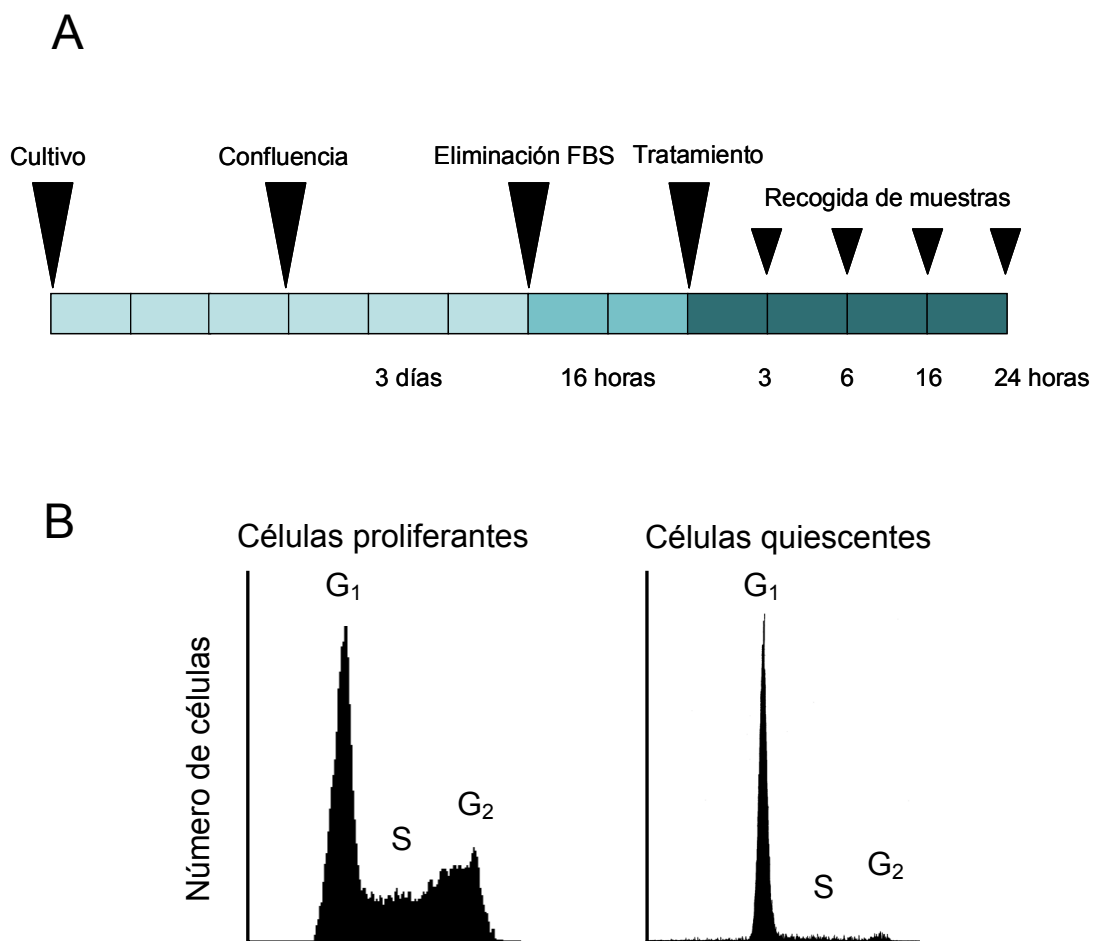


Figura 1. Células NRK-52E. A) Esquema general del diseño experimental. B) Distribución de células proliferantes o quiescentes entre las distintas fases del ciclo celular, según el contenido de ADN. Los datos mostrados se obtuvieron mediante análisis por citometría de flujo, de células teñidas con IP.

2. Apoptosis inducida por distintos nefrotóxicos en células NRK-52E quiescentes

Con el fin de caracterizar el proceso de apoptosis en células epiteliales de túbulo renal, se procedió a establecer las condiciones necesarias para que tenga lugar dicho proceso. Para ello, se estudió el efecto provocado por distintas concentraciones de agentes nefrotóxicos o duración de los tratamientos, sobre la aparición de células apoptóticas. En una primera aproximación, el grado de apoptosis inducido por el tratamiento, se determinó mediante la cuantificación de células con la cromatina fragmentada y condensada formando cuerpos apoptóticos. Estos cambios pueden ser apreciados al microscopio de fluorescencia tras tinción de la cromatina con el fluorocromo DAPI (Figura 2).

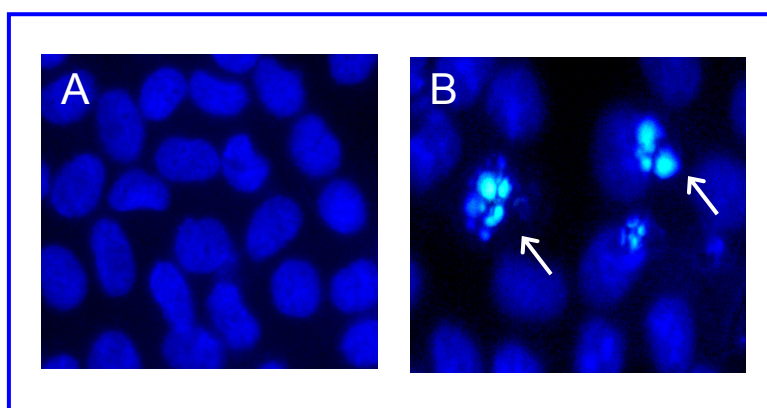


Figura 2. Inducción de apoptosis en células NRK-52E. A) Células sin tratar y B) células tratadas durante 24 h con 200 μ M de cisplatino (los cuerpos apoptóticos están indicados con flechas).

La capacidad para causar apoptosis celular, fue estudiada con distintas concentraciones de cisplatino (CDDP), arsenito (As_2O_3) y cadmio (CdCl_2) μ M. Un resumen de los resultados obtenidos se muestra en la figura 3, donde se puede apreciar que la capacidad de estos agentes para inducir apoptosis, es dependiente de la dosis suministrada. El porcentaje de apoptosis obtenido a las 24 h no supera el 40%, en ninguno de los casos estudiados.

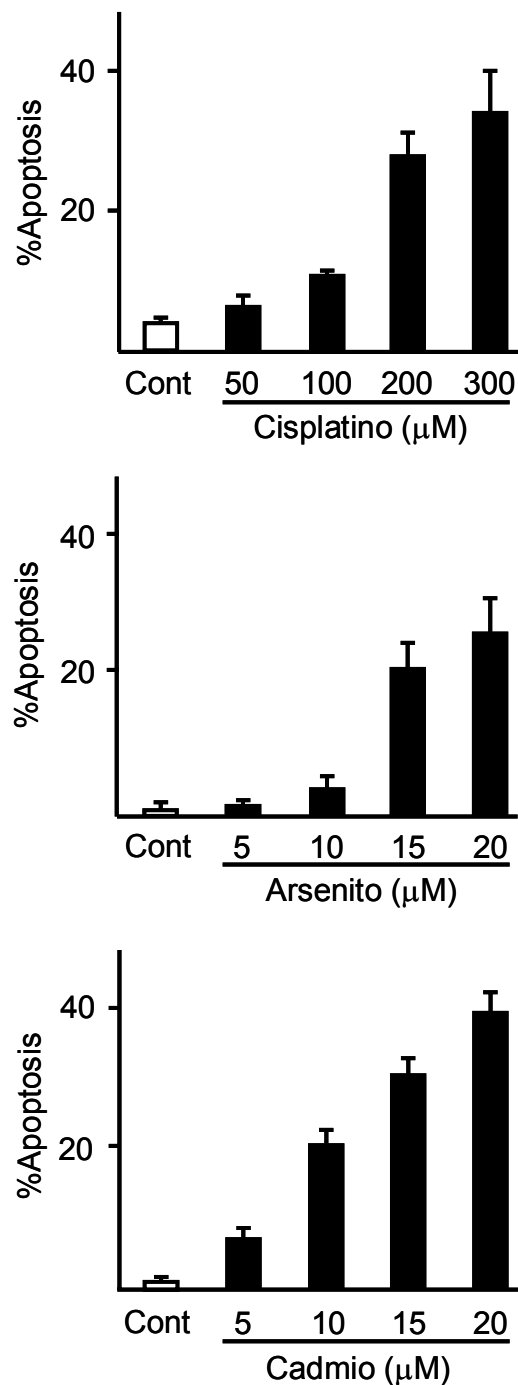


Figura 3. Apoptosis inducida por distintas concentraciones de cisplatino, arsenito y cadmio a las 24 horas de tratamiento. El porcentaje obtenido, mediante tinción con DAPI y recuento de células, es proporcional a la dosis del agente empleado. Los resultados están expresados como media \pm S.D. de al menos tres experimentos.

Para estudiar la cinética de inducción de apoptosis, se han utilizado las dosis mínimas a las que se obtienen porcentajes de células apoptóticas, comprendido entre 20-30%. Con las dosis seleccionadas: 200 μM de Cisplatino, 15 μM de As_2O_3 y 10 μM de CdCl_2 , se puede apreciar que es a partir de las 16 h cuando se hace patente la apoptosis.

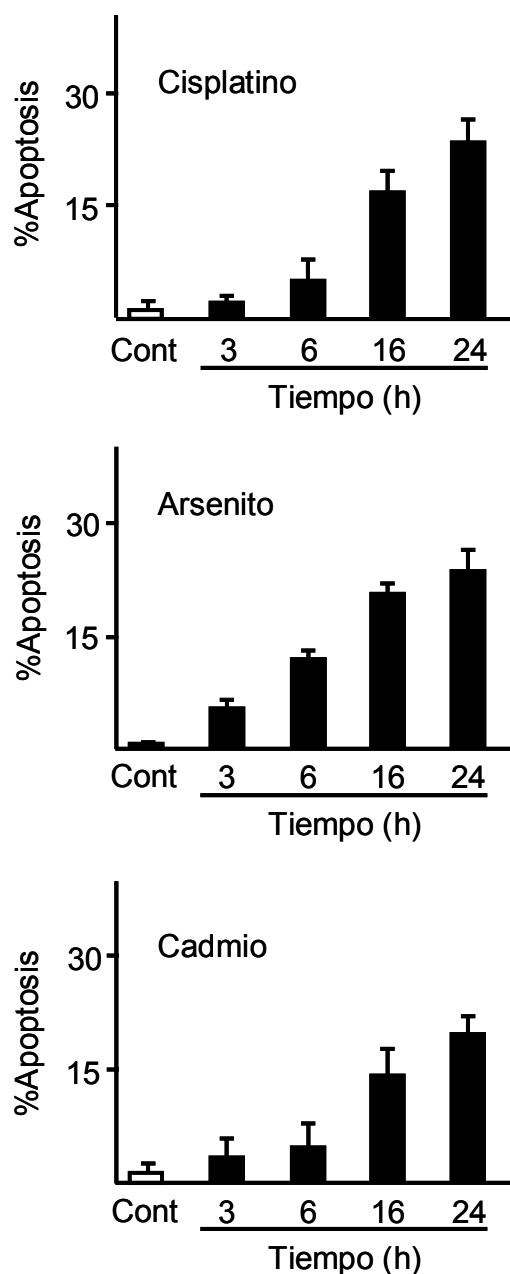


Figura 4. Apoptosis inducida por tratamientos de cisplatino (200 μM), arsenito (15 μM) y cadmio (10 μM) a los tiempos indicados. El porcentaje de apoptosis, obtenido mediante tinción con DAPI y recuento de células, empieza a ser significativo a partir de las 16 h. Los resultados están expresados como media \pm S.D. de al menos tres experimentos.

3. Efecto de cisplatino en el ciclo celular

Al analizar el ciclo celular en poblaciones tratadas con distintas concentraciones de cisplatino, se detectan células con un contenido de ADN inferior al de células en G1, sub-G1, que es característico de apoptosis (Figura 5). La magnitud de esta región, que determina el grado de fragmentación internucleosomal apoptótica del ADN, es dependiente de la concentración de cisplatino administrada. También se observa que cuando esta región alcanza ciertos niveles, comienza a aumentar, de manera muy tenue, la fase G2/M de células conforme aumenta la concentración de cisplatino utilizada.

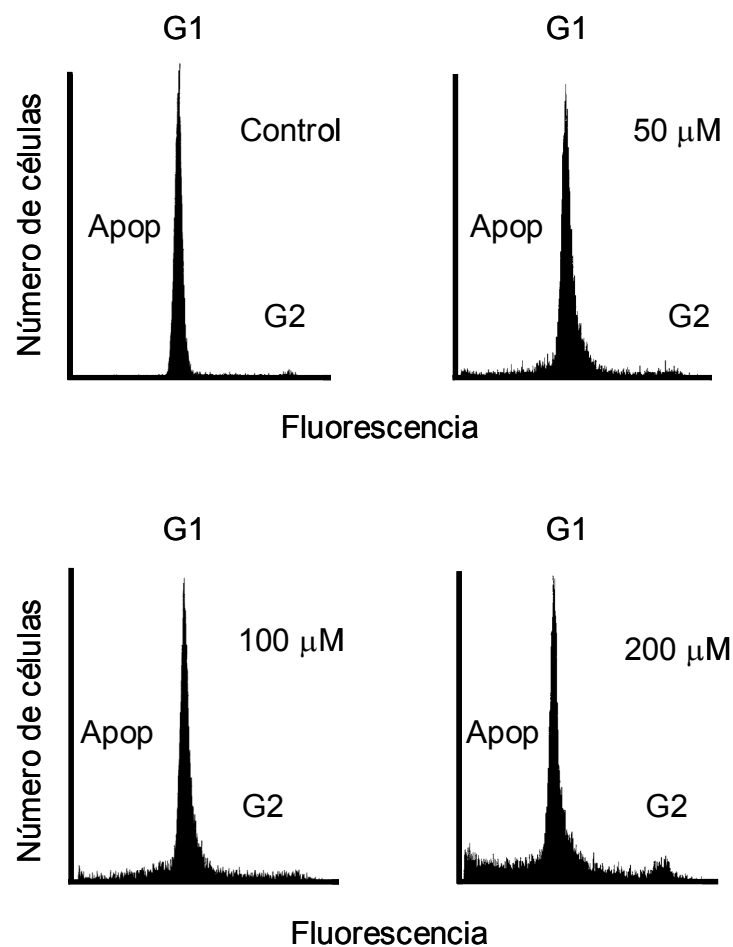


Figura 5. Modificación del ciclo celular por cisplatino. Distribución de células NRK-52E quiescentes, sin tratar o tratadas con las concentraciones indicadas de cisplatino durante 24 h, entre las distintas fases del ciclo celular, según su contenido en ADN. El contenido de ADN celular se determinó por citometría de flujo, a través del IP incorporado.

4. Implicación de MAP quinasas en la apoptosis inducida por cisplatino en células NRK-52E quiescentes

4.1. Efecto de cisplatino en MAPKs

Como ya se ha indicado, las MAPKs son factores esenciales en la regulación de la apoptosis. Pero su participación depende del agente inductor y del tipo celular utilizado. Para definir las rutas que median el proceso de apoptosis inducido por cisplatino en células NRK-52E, estudiamos la capacidad de 200 μ M de cisplatino para modular el estado de activación de p-38, ERK 1/2 y JNK MAP quinasas a través de los cambios observados en su estado de fosforilación. Como se muestra en la figura 6, ya las células control presentan ciertos niveles de MAPKs fosforiladas, y como resultado del tratamiento con CDDP, se aprecia un descenso de estos niveles de p38 fosforilada (p38-P) y en los de ERK2 (ERK2-P), sin aparente efecto sobre los de ERK1 (ERK1-P) y JNK (JNK-P). El descenso de p38-P y de ERK2-P fue siempre detectado a partir de las 3 horas del tratamiento.

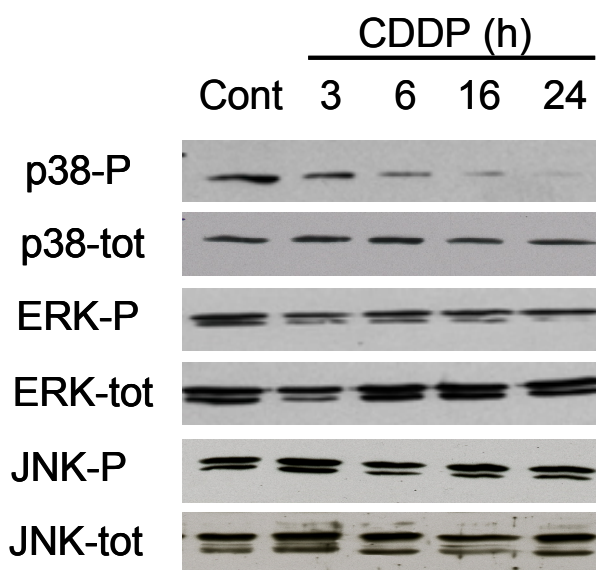


Figura 6. Efecto de cisplatino en la fosforilación de MAP quinasas. Se utilizaron 30 μ g de proteína por carril, de extractos totales de células sin tratar (Cont) o tratadas con 200 μ M de cisplatino (CDDP) para determinar los niveles de p-38-P, ERK-P y JNK-P, mediante inmunoblot a los tiempos indicados. También se trataron, las mismas membranas con anticuerpos que reconocen las formas totales (fosforiladas y no fosforiladas) de p38-tot, ERK-tot y JNK-tot, como control de carga. Se realizaron tres ensayos con resultados equivalentes.

4.2. Efecto de la inhibición de MAPKs en la apoptosis

Para establecer si existe relación entre los cambios observados en estas quinasas y el proceso de apoptosis inducido por cisplatino en NRK-52E, se estudio la incidencia de inhibidores farmacológicos de estas MAPK en dicho proceso. Para ello, se utilizaron los inhibidores farmacológicos SB203580 (SB1) y SB220025 (SB2) (a una concentración de 15 y 2 μ M, respectivamente), específicos de p38; PD98059 (PD) y U0126 (U) (a 40 y 10 μ M respectivamente), específicos de ERKs; y SP600125 (SP) (a 10 μ M), específico de JNK. Las concentraciones de inhibidores empleadas fueron establecidas previamente. Se observa, que los tratamientos con cada uno de los inhibidores resultan inocuos para las células, sin embargo, la combinación de cada uno de ellos con cisplatino, provoca efectos diferentes. Sólo los inhibidores SB1 y SB2 potencian la apoptosis inducidas por cisplatino, como puede observarse en la Figura 7A, y también SB1, potencia el efecto producido por cisplatino sobre los niveles de

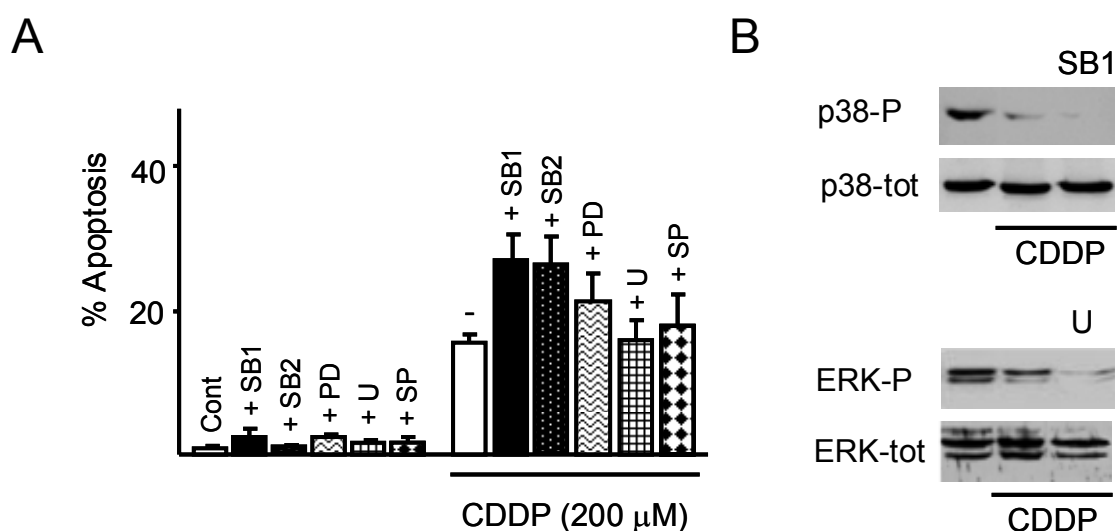


Figura 7. Inhibición de MAP quinasas y apoptosis inducida por cisplatino. A) Frecuencia de apoptosis en células sin tratar (cont) y células tratadas con 200 μ M de CDDP durante 24 horas; en estas condiciones se aplicaron 1hora antes los distintos inhibidores, SB203580 15 μ M (SB1), SB220025 2 μ M (SB2), PD98059 40 μ M (PD), U0126 10 μ M (U) y SP600125 10 μ M (SP). Los resultados están expresados como media \pm S.D. de al menos tres experimentos. B) Modulación, por los correspondientes inhibidores, de los niveles de p38-P y de ERK-P inducidos por cisplatino: los inmunoblot se realizaron en las mismas condiciones que los de la Figura 6.

p38-P (Figura 7B). Sin embargo, aunque el inhibidor U tiene el mismo efecto sobre los niveles de ERK2-P que el observado con p38-P (Figura 7B), ninguno de los inhibidores de ERK modifican los niveles de apoptosis inducidos por cisplatino (Figura 7A). Finalmente, comprobamos que la inhibición de JNK no altera sustancialmente los niveles de apoptosis.

4.3. Efecto de la modulación de p38-MAPK en apoptosis

La implicación de p38-MAPK en la protección de la apoptosis inducida por cisplatino en células NRK-52E, fue también estudiado mediante transfecciones transitorias con el plásmido de expresión pCDNA3 que contiene el cDNA de MKK6(K82A), defectivo en la función de fosforilar a p38-MAPK, (DN), o con el cDNA de MKK6(Glu) que expresa constitutivamente MKK6, DP (Raingeaud y col., 1996). Como control de la transfección celular se ha utilizado el plasmido recombinante pEGFP que contiene el cDNA que expresa la proteína verde (GFP). A pesar de la baja eficacia de transfección (aproximadamente un 40% de células transfectadas), en células transfectadas con el DN se detecta un aumento de apoptosis respecto a las células transfectadas con el plásmido pEGFP, proporcional a la concentración de cisplatino (Figura 8 A). De la misma manera que en células no transfectadas, la presencia del inhibidor SB1 aumenta los niveles de apoptosis inducidos por cisplatino (Figura 8 A). En células transfectadas con el DP, se observa un descenso de la apoptosis respecto a las células control proporcional a la concentración de cisplatino (Figura 8 A). En estos experimentos la cuantificación de la apoptosis se ha realizado por el método colorimétrico descrito en el kit de APOPercentageTM Assay. Mediante “western” blot controlamos los niveles de p38-P que corresponde a cada situación experimental (Figura 8 B).

5. **Papel de MAP quinasas en la apoptosis inducida por**

5.1. Arsenito y cadmio en células NRK-52E

Con el fin de contrastar si el papel mostrado por las MAPKs, en la apoptosis inducida en células NRK-52E, era específico del tratamiento con CDDP o también se podía observar con otros agentes nefrotóxicos, como As₂O₃ y CdCl₂, se repitieron los experimentos en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos en la apoptosis inducida por los tratamientos de estos agentes, en presencia o ausencia de los

inhibidores, son semejantes a los obtenidos con cisplatino, como puede apreciarse en la figura 9 A; los niveles de p-38-P también son modificados de la misma manera (Figura 9 B).

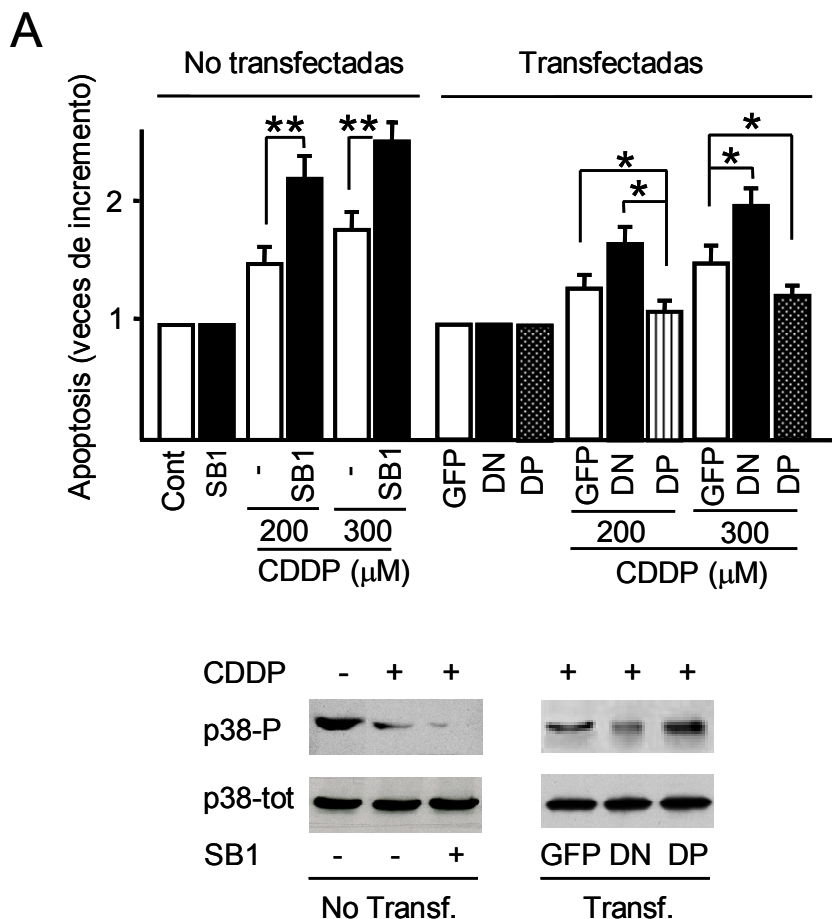


Figura 8. Transfecciones transitorias de células NRK-52E con mutantes de MKK6: dominante negativo (DN) o dominante positivo (DP). A) Apoptosis inducida por 200 o 300 μM de cisplatino en células sin transfectar, con o sin el inhibidor SB1, y células transfectadas con pEGFP, MKK6 (DN) o MKK6 (DP). En este caso la cuantificación de los niveles de apoptosis ha sido realizada mediante el kit APOPercentage™ Assay. Los valores de apoptosis obtenidos con las células no tratadas con cisplatino (control, SB1, GFP, DN y DP), son prácticamente iguales en todos los casos, y se les ha asignado el valor de 1. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). B) Niveles de p38 fosforilada en células NRK-52E no transfectadas, sin tratar y tratadas con CDDP (200 μM) ó SB1+CDDP, y transfectadas con pEGFP, DN o DP, y tratadas con 200 μM de cisplatino.

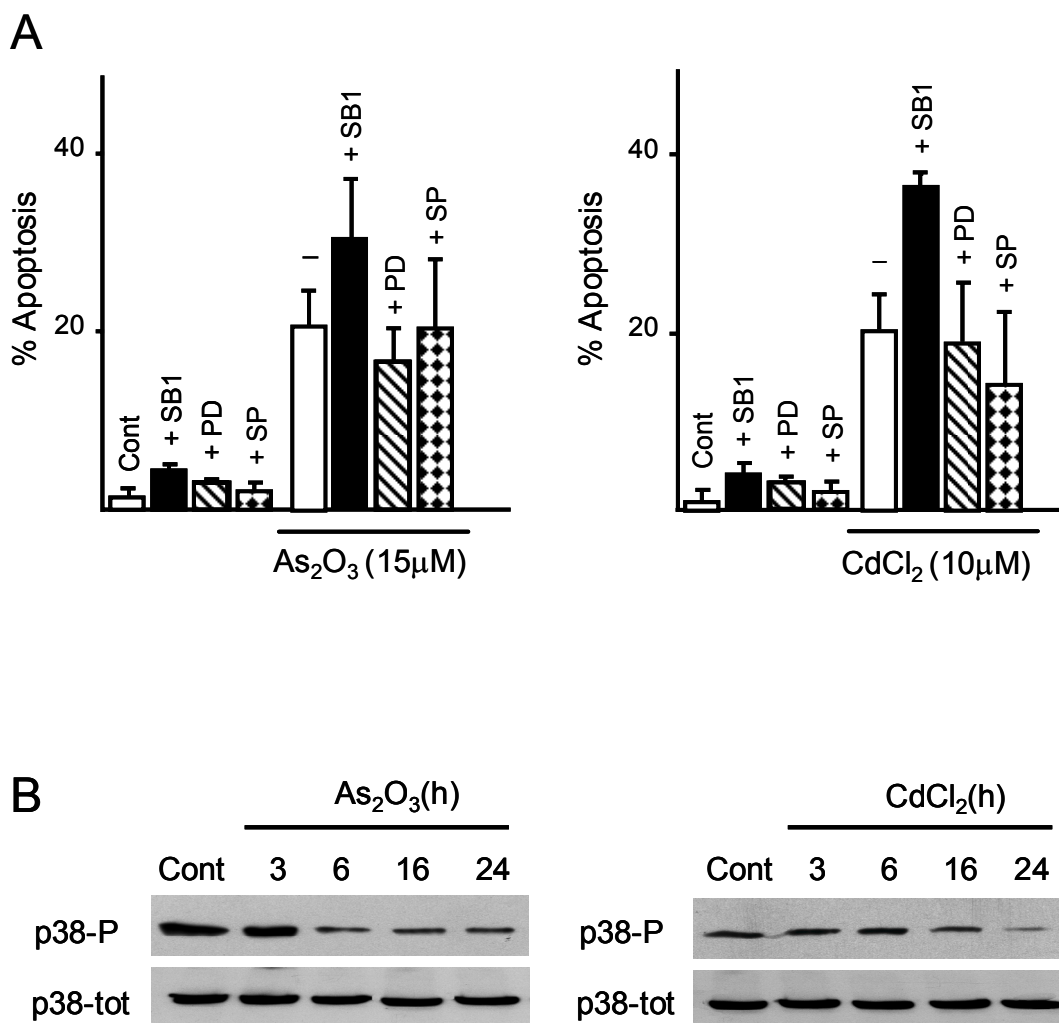


Figura 9. Inhibición de MAP quinasas y apoptosis inducida por arsenito o cadmio. A) Frecuencia de apoptosis en células tratadas con As_2O_3 o CdCl_2 durante 24 horas, o aplicando 1 hora antes, los distintos inhibidores: SB203580 15 μM (SB1), PD98059 40 μM (PD) y SP600125 10 μM (SP). Los resultados están expresados como media \pm S.D. de al menos tres experimentos. B) Extractos totales de células sin tratar (Cont) o tratadas con 15 μM de As_2O_3 o 10 μM de CdCl_2 , fueron utilizadas para determinar los niveles de p38-P mediante inmunoblot, a los tiempos indicados, y en las mismas condiciones que se describen en la Figura 6.

5.2. Cisplatino en células LLC-PK1, HK-2 y MDCK

Considerando, como se ha comentado antes, que la participación de las MAPKs en apoptosis puede variar con el tipo celular, analizamos el comportamiento de p38-MAPK en otros tipos de células renales. Examinamos el papel de esta MAPK en la apoptosis inducida por cisplatino, en líneas de epitelio tubular renal proximal LLC-PK1 (cerdo), HK-2 (humano), y distal MDCK (perro) en las mismas condiciones experimentales. Se prepararon células quiescentes de cada tipo celular y se trataron con distintas concentraciones de cisplatino sólo o en presencia del inhibidor SB1 y se analizó su efecto en la apoptosis, como puede verse en la Figura 10 A. También se utilizaron extractos procedentes de estas células sometidas a las concentraciones y tiempos que se indican en la Figura 10 B, para detectar, por inmunoblot, la evolución de los niveles de p38-P con la inducción de apoptosis. Se observa la misma relación entre esta MAPK y la apoptosis que la definida en células de rata.

5.3. Cisplatino en células NRK-52E proliferantes

Para comprobar si el comportamiento observado en células quiescentes, era particular de este estado celular, se repitieron los mismos experimentos con células proliferantes. En estas células, el tratamiento con cisplatino produce el efecto contrario en los niveles de p38-P que el observado en células quiescentes (Figura 11 A). De la misma manera, la inhibición de p38 MAK por SB1 produce el efecto contrario en los niveles de apoptosis (Figura 11 B). También se puede apreciar que las células proliferantes son más sensibles al tratamiento, presentando mayor porcentaje de apoptosis en las mismas condiciones.

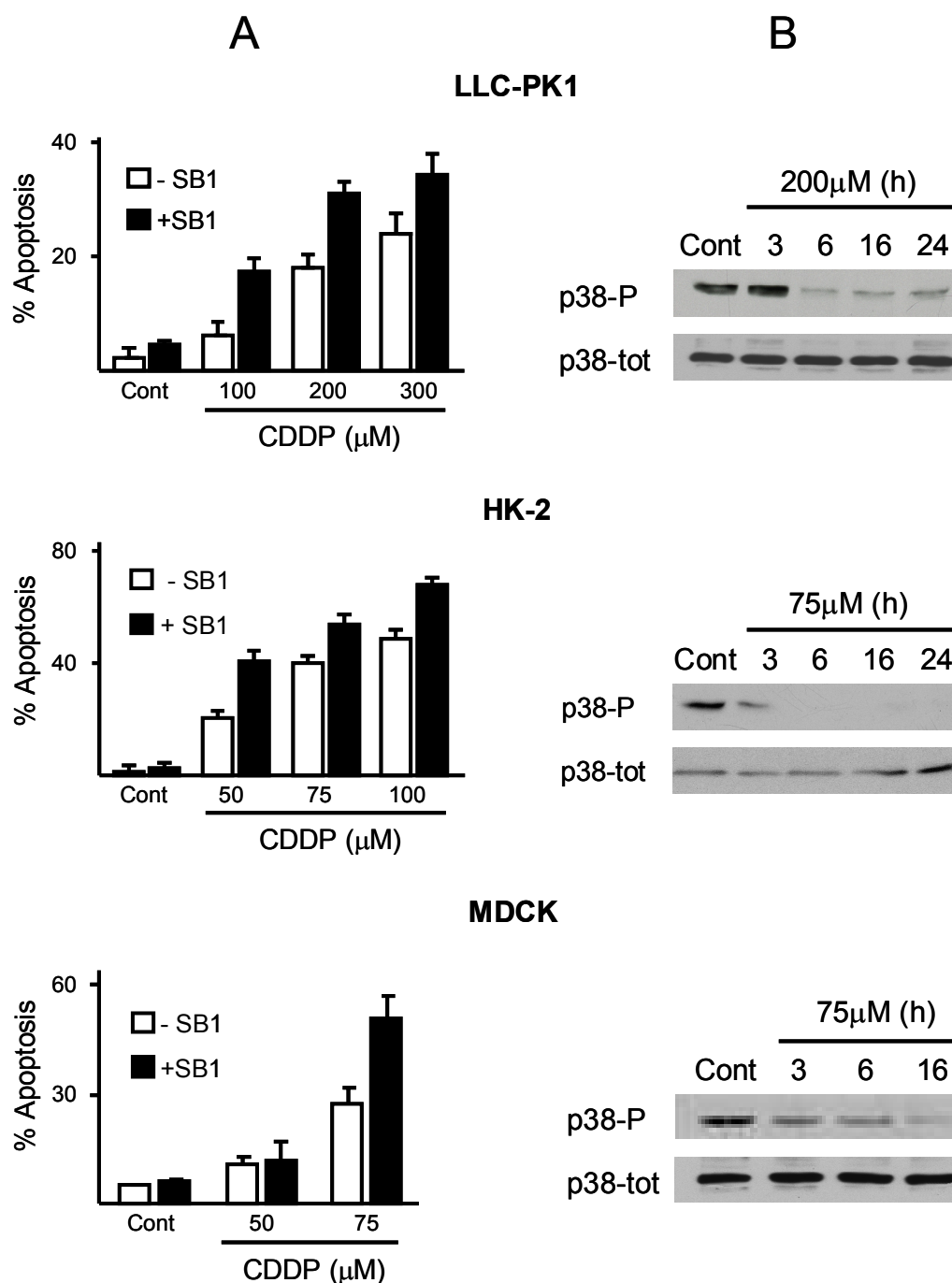


Figura 10. Apoptosis inducida por cisplatino en células del epitelio tubular renal proximal (LLC-PK1 cerdo, HK-2 humano) y distal (MDCK perro). A) Tratamientos de 24h con cisplatino (CDDP) sin (-)/con (+) SB1 (15μM) inducen apoptosis en las distintas líneas celulares de una manera dosis dependiente. B) Niveles de p38-P en células sin tratar (Cont) y células tratadas con las dosis de CDDP y a los tiempos indicados, determinados mediante inmunoblot con los anticuerpos que reconocen específicamente la forma fosforilada p38-P o la forma total p38-tot.

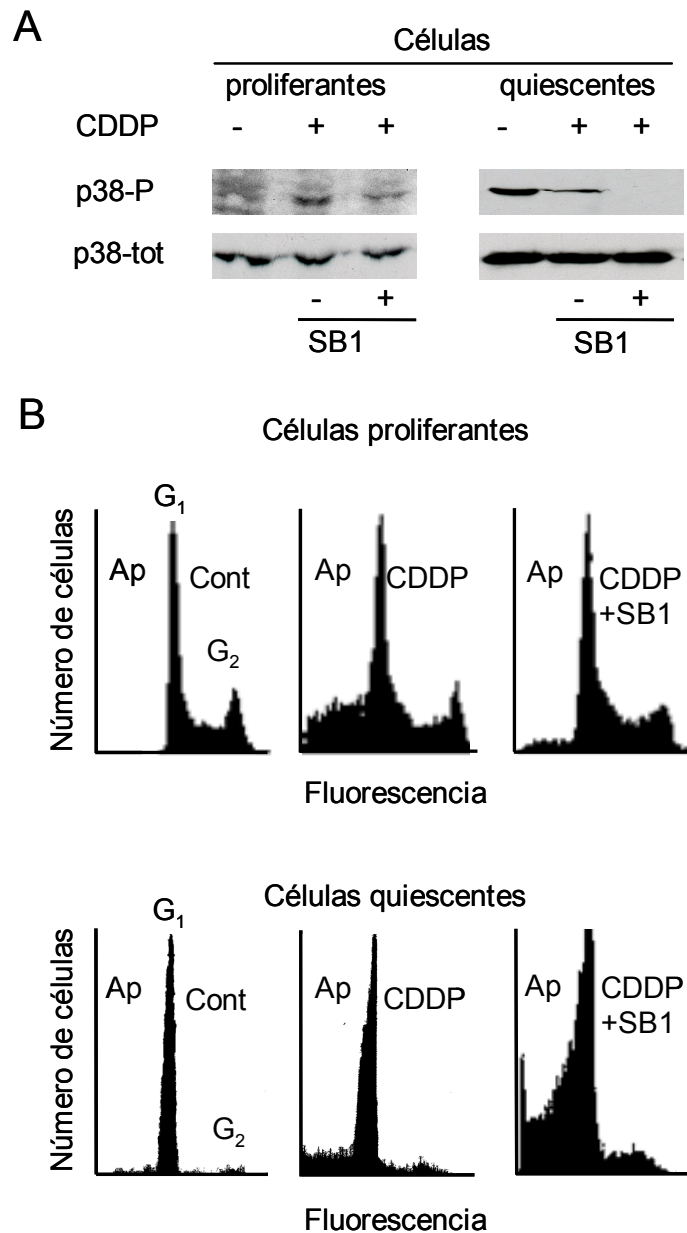


Figura 11. Inhibición de p38 MAP quinasa y apoptosis en células proliferantes y quiescentes. A) Modulación de los niveles de p38-P por SB1 en células proliferantes o quiescentes, tratadas con cisplatino. B) Frecuencia de apoptosis en células proliferantes o quiescentes sin tratar (cont), células tratadas con 200 μ M de CDDP durante 24 horas y células tratadas con CDDP + SB1.

6. Regulación de la apoptosis por p38-MAPK

6.1. Participación de proteínas de choque térmico

Se ha descrito, en muchas ocasiones, la implicación de las distintas subfamilias de proteínas de choque térmico en la protección frente a apoptosis inducida por distintos agentes. Considerando además, que la fosforilación de Hsp27 es dependiente de p38-MAPK, sería lógico pensar que el tratamiento de las células con cisplatino tendría el mismo efecto sobre Hsp27 que el observado con p38-MAPK. Sin embargo, no se pudo detectar la presencia de Hsp27 total ni en células NRK-52E, ni en células LLC-PK1 control o tratadas con cisplatino a tiempos diferentes, tampoco se observa la presencia de la proteína de choque térmico Hsp70 (Figura 12 A). Los mismos resultados fueron obtenidos frente a tratamientos con arsenito (Figura 12 B), pero no ocurrió lo mismo con cadmio (Figura 12 B).

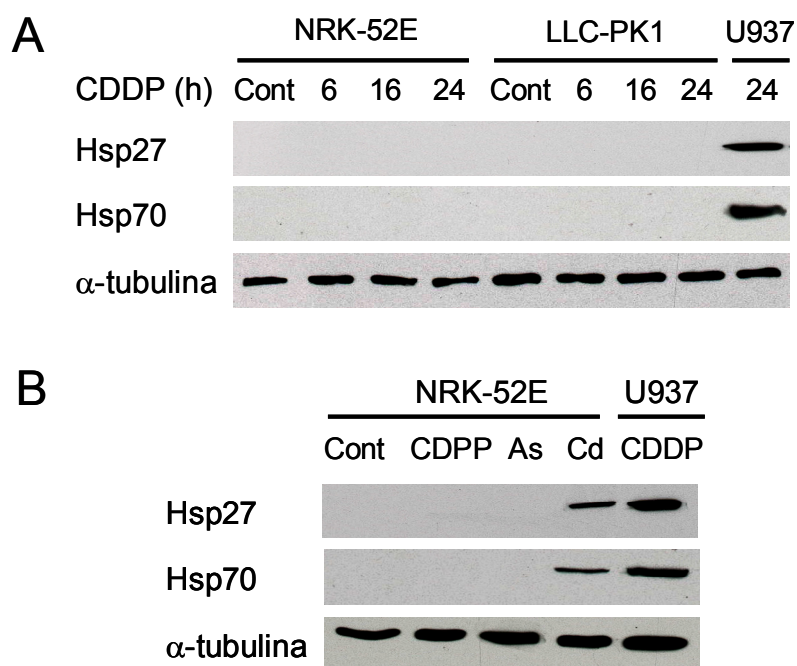


Figura 12. Expresión de proteínas Hsp en respuesta a distintos agentes citotóxicos. A) Niveles de Hsp27 y Hsp70 en 30 μ g de proteínas procedentes de células renales de rata (NRK-52E) o cerdo (LLC-PK1), sometidas a tratamientos de cisplatino durante los tiempos indicados. B) Niveles de Hsp27 y Hsp70 en células renales de rata tratadas con cisplatino, arsenito, o cadmio, durante 24h. Como control positivo se han utilizado 15 μ g de proteínas procedentes de células leucémicas promonocíticas tratadas durante 2 horas con cloruro de cadmio (200 μ M).

6.2. Papel de las caspasas 8 y 3

Las caspasas son elementos clave en la regulación de la apoptosis, participando tanto en etapas tempranas o iniciadoras como en etapas tardías o ejecutoras del proceso (Lau, 1999; Yano y col., 2007). Por este motivo quisimos comprobar el efecto del inhibidor de caspasas 8 (de intervención temprana) y 3 (de intervención tardía), Z-VAD-fmk, sobre el porcentaje de células apoptóticas inducido por cisplatino. Como se puede apreciar en la Figura 13 A, la presencia de dicho inhibidor reduce la apoptosis un 75%, aproximadamente. Pero también comprobamos que la presencia del inhibidor específico de caspasa 8, Z-IETD, no modifica los niveles de apoptosis producidos por cisplatino (Figura 13 B). Estos resultados parecen indicar que la caspasa 8 no está involucrada en la activación de apoptosis y que la reducción observada con Z-VAD-fmk, sólo se debe a la inhibición de caspasa 3. No se pudo determinar la cinética de activación de caspasa-8, ni la rotura de la pro-caspasa por inmunoblot, por este motivo se procedió a evaluar la presencia de la forma activa de caspasa 8 a través de su implicación en la rotura de la proteína Bid. Mediante la utilización de un anticuerpo, que sólo detecta la proteína Bid sin fragmentar, no se observó en el inmunoblot ninguna variación significativa en los niveles de dicha proteína a lo largo del tratamiento, ni tampoco en presencia del inhibidor Z-VAD-fmk (Figura 13 C).

Cuando estudiamos la cinética de activación de caspasa 3 en las células tratadas respecto a las células control, observamos que ésta comienza a detectarse a partir de las 16h de tratamiento (Figura 13 D). Estos resultados fueron confirmados mediante el estudio de la cinética de rotura de la proteína quinasa δ (PKC δ) por caspasa 3 en células tratadas (Figura 13 E), donde se puede apreciar que el fragmento catalítico de 41 kDa t-PKC δ (Ghayur y col., 1996) es detectado al tiempo en que se observa la activación de caspasa 3 (Figura 13 D).

Para determinar la relación entre p38-MAPK y caspasa 3, estudiamos el efecto del inhibidor específico de esta MAPK, SB1, en la activación de caspasa 3. Comprobamos que la activación de caspasa 3 está bajo el control de p38-MAPK, y que el aumento de la apoptosis que hemos observado en presencia del inhibidor, a las 24 horas de tratamiento con cisplatino (Figura 7), parece deberse a que su presencia adelanta el proceso de activación de caspasa 3 (Figura 14 A, B). También puede observarse en la Figura 14 C que, ya, a las 6 horas de tratamiento, la presencia del inhibidor SB2 potencia ligeramente, el descenso de p38-P inducido por cisplatino. Además, descartamos una posible regulación “feedback” de p38-MAPK por la caspasa 3 a

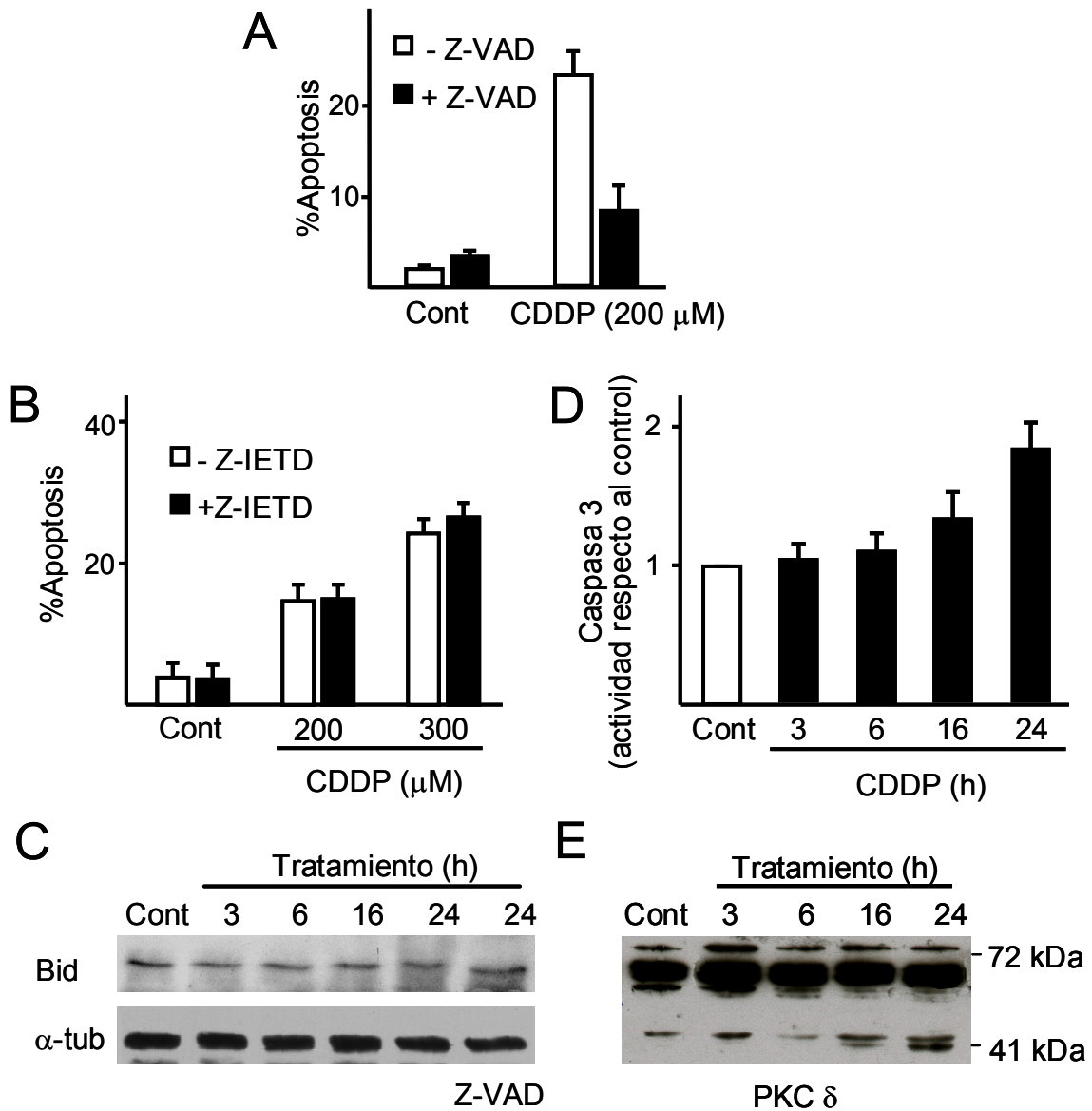


Figura 13. Participación de caspasas 8 y 3 en la apoptosis inducida por cisplatino en células NRK-52E. Frecuencia de células apoptóticas (teñidas con DAPI) en cultivos celulares sin tratar y tratados con 200 μ M de CDDP en ausencia o presencia del inhibidor de caspasas 8 y 3, Z-VAD, (A) o del inhibidor específico de caspasa 8, Z-IETD, en células no tratadas o tratadas con 200 o 300 μ M de CDDP, (B). C) Inmunoblot con los niveles de proteína Bid sin fragmentar por caspasa 8: a la concentración de cisplatino y a los tiempos que se indican. D) Activación del sustrato Ac-DEVD-pNA por caspasa-3 en células tratadas con 200 μ M de CDDP respecto a células sin tratar a las que se ha dado el valor arbitrario de 1. E) Cinética de obtención del fragmento catalítico t-PKC δ de 41 kDa tras la rotura de PKC δ (70 kDa) por caspasa 3.

tiempos largos, como ha sido descrito por (Grethe y col., 2004), ya que no se observan modificaciones entre los niveles de p38-P correspondientes a células tratadas con cisplatino en ausencia o en presencia del inhibidor de caspasas Z-VAD-fmk (Figura 14D).

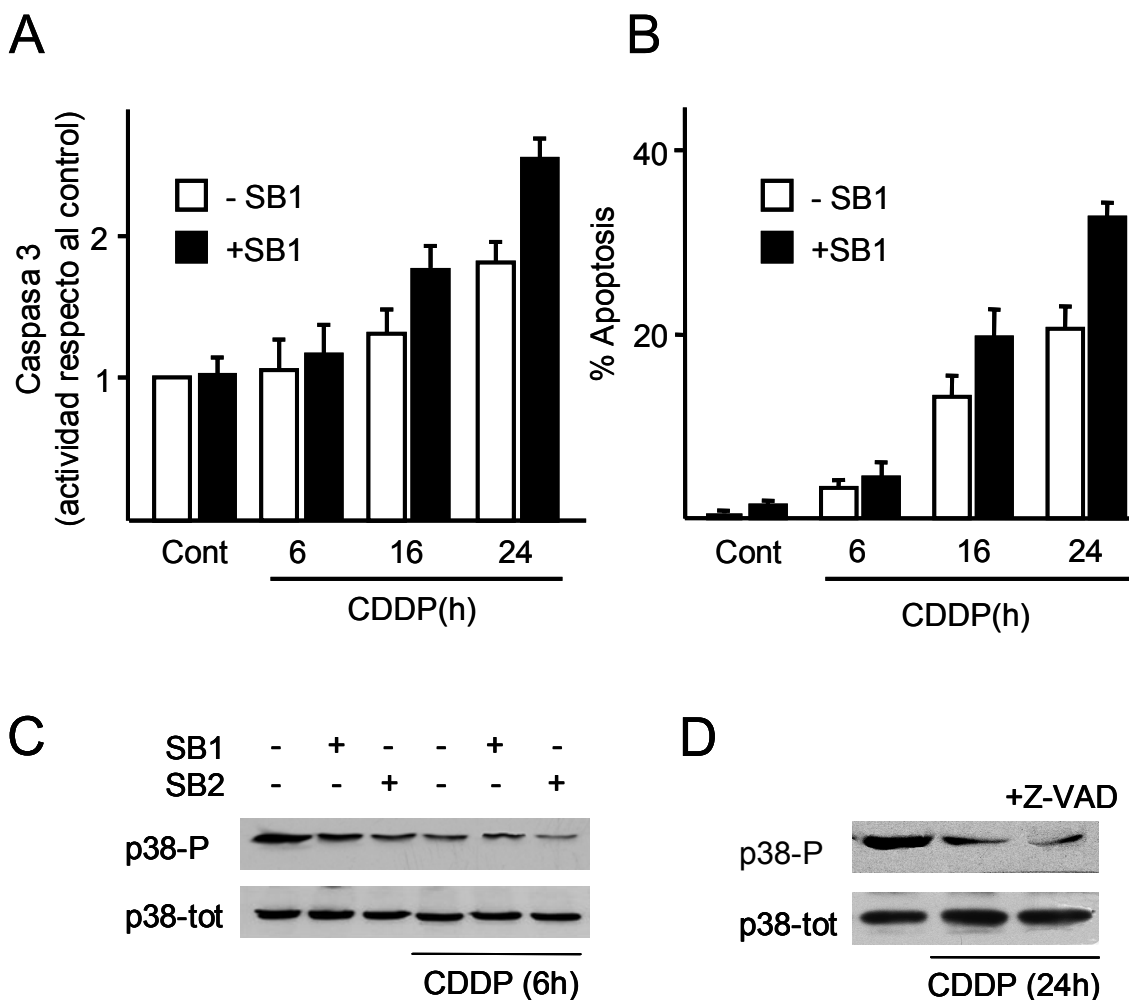


Figura 14. Relación de caspasa-3 y p38-MAPK.

A) y B) Activación de caspasa 3 y niveles de apoptosis a los tiempos indicados en células tratadas con CDDP en ausencia o presencia del inhibidor SB1. C) Efecto de los inhibidores SB1 y SB2, en los niveles de p38-P de células tratadas con CDDP D) Efecto del inhibidor de caspasas, Z-VAD, en los niveles de p38-P de células tratadas con CDDP. Los histogramas y los inmunoblots son representativos de dos o tres experimentos con resultados similares.

6.3. Translocación de citocromo c y disipación del potencial de membrana mitocondrial

La translocación de citocromo c de la mitocondria al citosol o simplemente un aumento de la presencia de citocromo c en el citosol por microinyección, como se ha descrito en células renales NRK-52E (Chang y col., 2000), se considera un factor imprescindible para la formación del apoptosoma y determinante en la activación de la caspasa 3 y otras caspasas ejecutoras de la apoptosis. Se puede observar en el inmunoblot de la Figura 15 A que el tratamiento con distintas dosis de cisplatino que inducen apoptosis en la célula, provocan una liberación de citocromo c al citosol proporcional a la dosis empleada. Por otro lado, observamos que es a partir de las 6 horas de tratamiento con 200 μ M de cisplatino cuando se observa la presencia de citocromo c en la fracción citosólica y esa presencia es mayor cuando se añade el inhibidor SB1, 30 minutos antes, y se mantiene durante el tratamiento con cisplatino (Figura 15 B.).

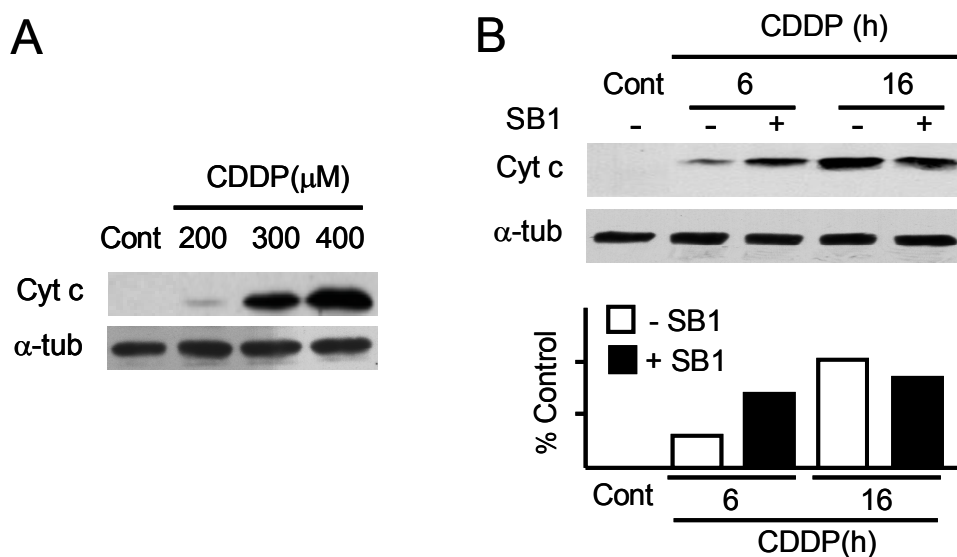


Figura 15. Implicación de cisplatino en la translocación de citocromo c, y su modulación con inhibidores de p38-MAPK. Inmunoblot de 50 μ g de extractos citosólicos tratados con anticuerpos que reconocen citocromo c o α -tubulina (control de carga) muestran la acumulación de citocromo c en citosol de: A) células no tratadas o tratadas durante 24h con dosis crecientes de cisplatino, B) células tratadas durante los tiempos indicados con 200 μ M de cisplatino en ausencia o presencia del inhibidor SB1.

También se ha descrito que la mayoría de los agentes citotóxicos producen la permeabilización de la membrana mitocondrial, permitiendo la entrada de protones a la matriz y disipando la diferencia de potencial de la membrana mitocondrial con la consiguiente liberación de proteínas intramitocondriales entre las que se encuentra el citocromo c. Por este motivo, estudiamos posibles modificaciones de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) cuando se induce apoptosis. La disminución del potencial de membrana causado por cisplatino, y determinado por el descenso de fluorescencia derivada de la sonda rodamina123, es proporcional a la concentración de agente empleado (Figura 16 A). Por otra parte, estudiamos el efecto de la presencia del inhibidor de p38-MAPK, SB1, en el descenso del potencial de membrana inducido. Como se puede apreciar en la Figura 16 B, la presencia del inhibidor no tiene ningún efecto, por sí sólo, ni sobre el potencial de la membrana mitocondrial ni en la apoptosis (Figura 7A), pero en presencia de cisplatino, el inhibidor aumenta el efecto producido por este agente en el potencial de membrana y en los niveles de apoptosis (Figura 7A). También se analizó, cuándo, comienza a observarse la regulación por el inhibidor sobre el efecto de cisplatino en el potencial de membrana mitocondrial. Llevando a cabo el mismo tipo de experimento, pero a tiempos más cortos, pudimos comprobar que a las 3 horas de tratamiento con cisplatino no se aprecia ninguna variación con respecto al control, pero la presencia del inhibidor SB2, junto con cisplatino, produce una ligerísima disminución en el potencial de membrana (Figura 16 C).

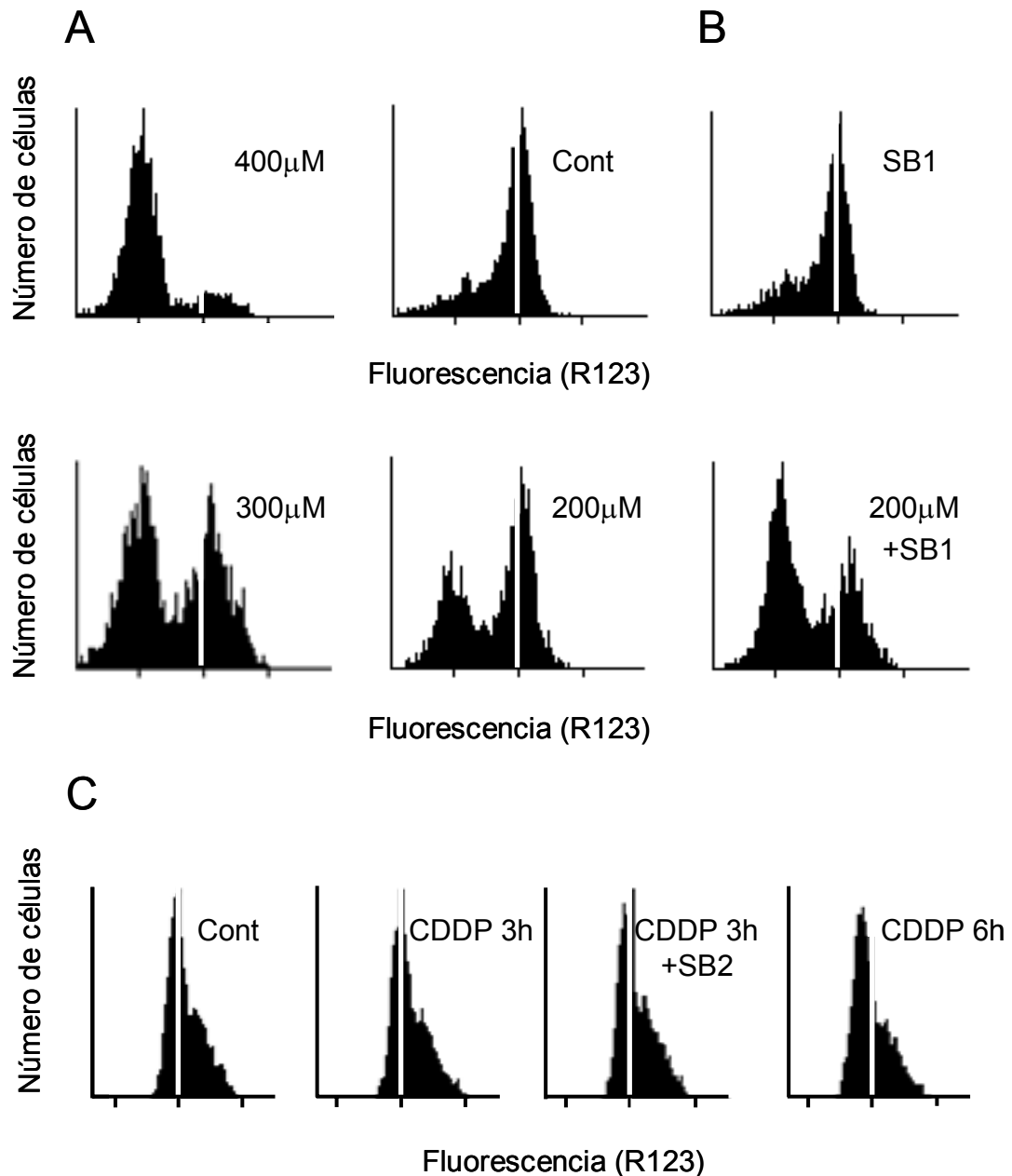


Figura 16. Efecto de cisplatino en la permeabilización de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y modulación con inhibidores de p38-MAPK.

A) Los histogramas muestran la distribución de células no tratadas o tratadas con distintas concentraciones de cisplatino según la fluorescencia derivada de la sonda R123 a las 24 h de tratamiento. B) Distribución de células tratadas durante 24 h con 200μM de cisplatino en ausencia o presencia de SB1. C) Células tratadas con 200μM de cisplatino en ausencia o presencia del inhibidor, SB2, durante 3 ó 6 h de tratamiento.

6.4. Implicación de proteínas de la familia Bcl-2

Las proteínas de la familia Bcl-2, como ya se ha explicado con anterioridad, constituyen importantes factores reguladores de la muerte celular a través de la ruta mitocondrial. Por ello, se quiso evaluar el grado de participación de elementos pertenecientes a este grupo, entre los que se encuentran proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-X_L y proteínas proapoptóticas como Bax y Bid, en la apoptosis inducida por cisplatino. En nuestro modelo celular no detectamos la presencia de la proteína Bcl-2, pero sí la presencia de la proteína Bcl-X_L. Como se puede apreciar en el inmunoblot que aparece en la Figura 17 A, estos niveles característicos de las células control se van reduciendo progresivamente con el tratamiento de cisplatino a lo largo del tiempo, alcanzando niveles casi imperceptibles a las 24 horas. Sin embargo, los niveles totales de la proteína proapoptótica Bax no son detectados en las células control, y en las células tratadas se observa un aumento progresivo a partir de las 3 horas. La cinética de la variación de los niveles de Bax y Bcl-X_L se representa en la Figura 17 B, donde se exponen los resultados obtenidos con la densitometría realizada sobre cada una de las muestras y corregida con los niveles obtenidos de α -tubulina. Los niveles de la proteína Bid no se modifican con el tratamiento a ninguno de los tiempos estudiados, como hemos mostrado en la Figura 13 C.

La relación de p38-MAPK con los niveles de expresión de Bax y Bcl-X_L se puede apreciar en la Figura 17 C. La presencia de uno de los inhibidores de p38-MAPK, potencia las variaciones inducidas por cisplatino a las 24 horas de tratamiento. También estimamos la influencia de este inhibidor en la translocación inducida por cisplatino de la proteína Bax desde el citosol a la mitocondria. Preparamos fracciones citosólicas de células no tratadas y tratadas con cisplatino sin y con inhibidor y realizamos “western” blot para analizar los niveles de la proteína Bax presentes en estas fracciones después de los tratamientos. Podemos apreciar en la figura 17 D uno de los inmunoblot realizados, donde se observa que el tratamiento con cisplatino sólo o con el inhibidor disminuye los niveles de proteína Bax respecto a los niveles observados en los extractos citosólicos de las células sin tratar. Teniendo en cuenta que los niveles totales de la proteína Bax que se observan a las 24 horas de tratamiento con SB1+ cisplatino son superiores a los obtenidos con cisplatino sólo (Figura 17 C), habrá tenido que movilizarse mas cantidad de proteína a las mitocondrias para quedar igualados en ambas fracciones citosólicas.

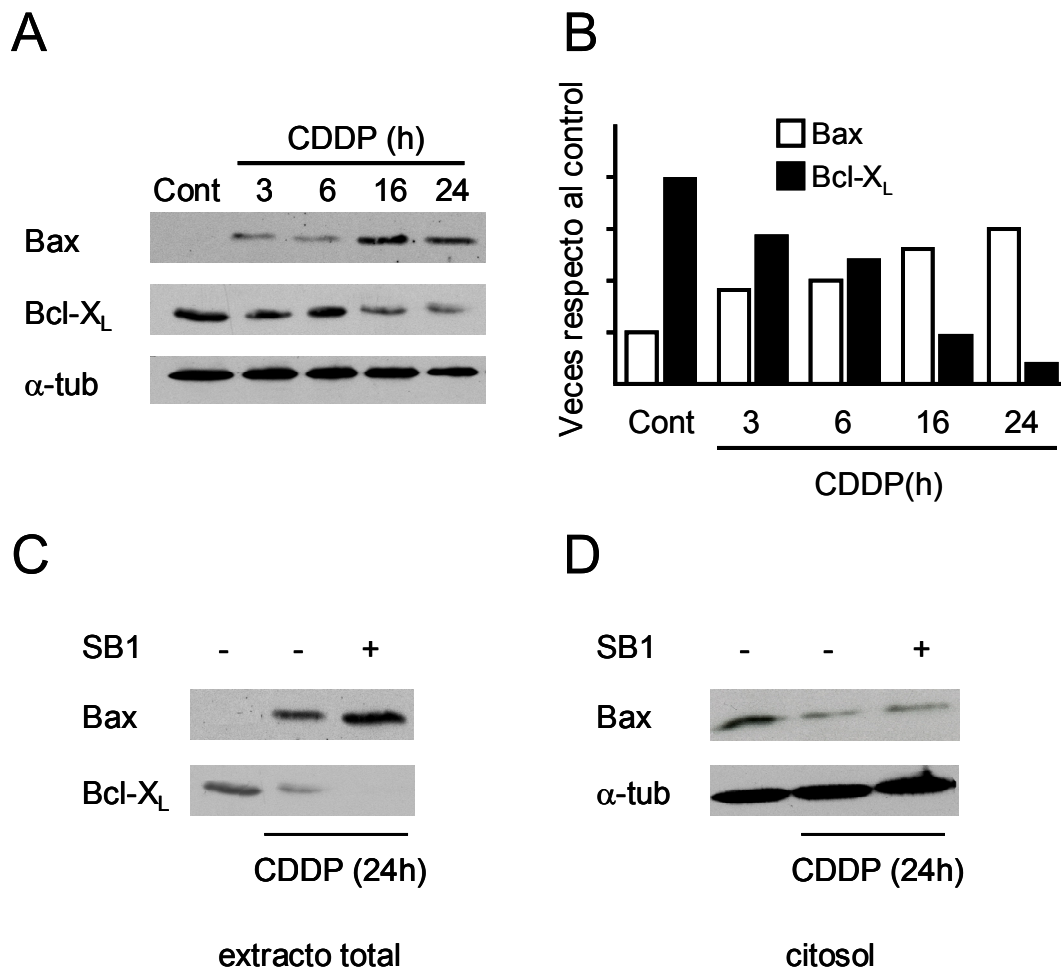


Figura 17. Variaciones de los niveles de proteínas Bax y Bcl-X_L durante la inducción de apoptosis y su modulación con SB203580, y de la translocación de Bax a las 24 h de tratamientos. A) Las células se trataron con CDDP a los tiempos indicados, después fueron lisadas y se aplicaron 30µg de proteína por carril de extractos celulares, para determinar los niveles de Bax y Bcl-X_L mediante inmunoblot (α -tubulina fue utilizada como control de carga). B) Cuantificación por densitometría de los niveles de expresión del inmunoblot del apartado A) y corregidos con los de α -tubulina. C) Influencia de SB203580 en el efecto de cisplatino sobre los niveles de las proteínas Bax y Bcl-X_L. D) Niveles de la proteína Bax en la fracción citosólica de células sin tratar o tratadas con CDDP o CDDP+SB1.

Para estimar el momento en que el inhibidor empieza a modificar los niveles de Bax y de Bcl-X_L inducidos por cisplatino, realizamos una serie de tratamientos a los tiempos que se indican en la Figura 18, en ausencia o presencia del inhibidor. Se observa en el inmunoblot mostrado, que a partir de las 6 horas de tratamiento se podría establecer el inicio de la modulación por el inhibidor SB1 en todos los miembros de la familia Bcl2 estudiados. En el caso de la proteína Bid, apreciamos un descenso en los niveles de la preforma inactiva de 21 kDa al romperse para dar lugar a la forma activa (Figura 18).

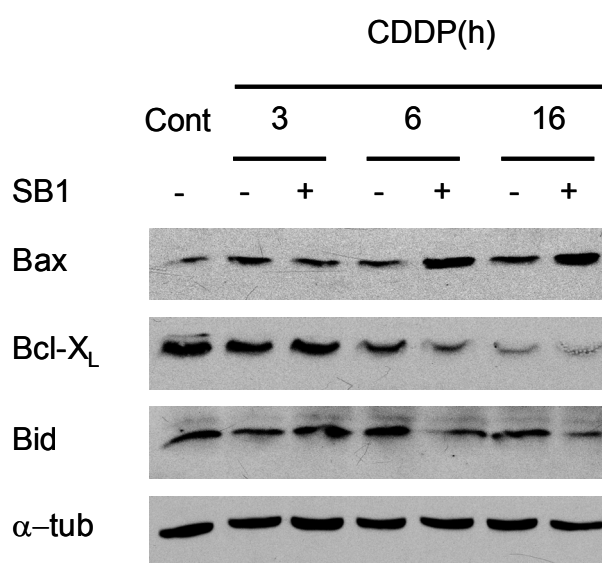


Figura 18. Efecto de SB203580 en los niveles relativos de Bax, BclxL y Bid a tiempos cortos de tratamientos. Las células fueron expuestas a CDDP durante los tiempos indicados, y el inhibidor SB fue aplicado 30 minutos antes del tratamiento. Después de cada tratamiento las células fueron lisadas y se utilizaron 30µg de proteína por carril, de extractos celulares para determinar los niveles de Bax, Bcl-X_L y Bid a los períodos de tiempo indicados mediante inmunoblot (α -tubulina fue utilizada como control de carga).

7. Relación de p38-MAPK con elementos de control temprano de la apoptosis

7.1. Activación de la proteína p53

Teniendo en cuenta que uno de los elementos relacionados con la inducción temprana de apoptosis celular, es la proteína p53, se quiso estudiar si la fosforilación-activación de dicha proteína era dependiente de p38-MAPK. Para ello se realizó un inmunoblot con extractos celulares que habían sido tratados con cisplatino sólo o con el inhibidor SB a tiempos cortos. Como se aprecia en la Figura 19 no se observan variaciones significativas en los niveles de la forma activa de p53 en presencia del inhibidor, con respecto a los mostrados en su ausencia, luego la activación de p53 no parece estar bajo el control de esta MAPK.

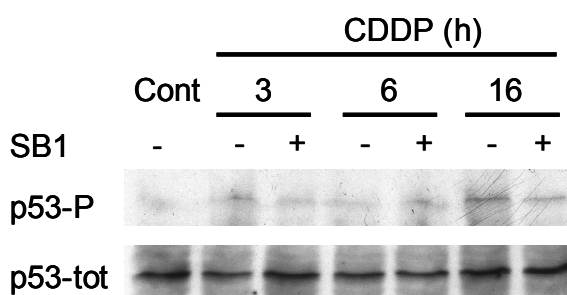


Figura 19. Efecto de SB203580 en los niveles relativos de p53-P a tiempos cortos. Las células fueron tratadas con 200 μ M de cisplatino sólo, o con SB aplicado 30 minutos antes del tratamiento a los tiempos indicados. En cada carril se aplicaron 30 μ g de proteínas procedentes de los extractos obtenidos para determinar los niveles de p53-P y de p53-tot, en cada caso.

7.2. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se ha sugerido que cisplatino puede generar especies reactivas de oxígeno (ROS) en distintos tipos celulares y ser un importante mediador en la muerte celular apoptótica o necrótica, además de otros muchos procesos biológicos. Por este motivo analizamos si durante la inducción de apoptosis se producía una acumulación intracelular de estos productos y su posible modulación por inhibidores de p38-MAPK, mediante la utilización de la sonda fluorescente H₂DCF-DA. Los niveles observados de ROS durante la etapa temprana donde se decide el inicio del proceso, no parecen modificarse por el tratamiento con cisplatino y tampoco la presencia de los inhibidores

SB1 o SB2, parecen mostrar un comportamiento claro en este sentido (Figura 20). Para contrastar estos resultados, estudiamos el efecto causado por la presencia de determinados antioxidantes en la apoptosis inducida por cisplatino. Utilizamos butilhidroxianisol (BHA), que es un antioxidante fenólico inespecífico, catalasa que es un antioxidante específico frente a H_2O_2 y no se utilizó N-acetilcisteína (NAC) porque los grupos SH de esta molécula antioxidante tienen gran afinidad por cisplatino y eso invalidaría su función como antioxidante. Se puede observar en la Figura 21 que la presencia de BHA solo atenúa la apoptosis inducida por concentraciones más altas de cisplatino que las que utilizamos en nuestros experimentos, donde ya la apoptosis está más avanzada y las células mueren por necrosis. La presencia de catalasa no parece modificar los niveles de apoptosis a ninguna de las concentraciones probadas. Por tanto, estos resultados confirmarían que durante la inducción de apoptosis no se modifican los niveles de ROS.

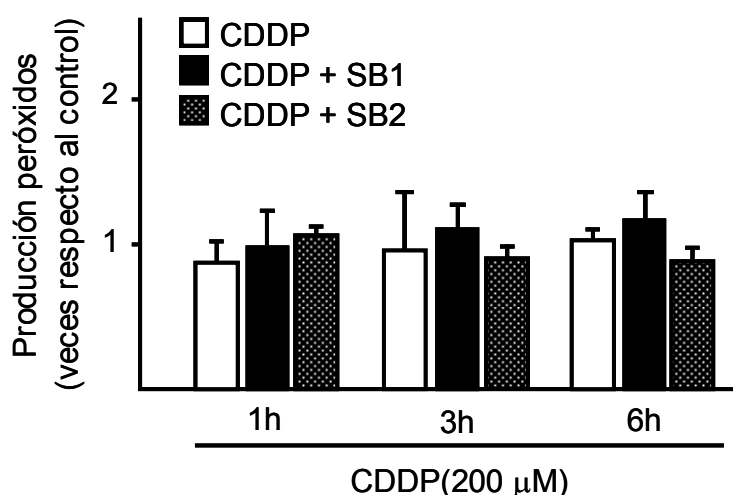


Figura 20. Niveles relativos de ROS en apoptosis inducida por cisplatino. Los niveles de ROS en células tratadas, medidos con la sonda fluorescente $H_2DCF-DA$, se ha referido a los de las células sin tratar a las que se ha dado el valor arbitrario de 1. Las células fueron tratadas con 200 μM de cisplatino sólo, o con SB1 o SB2 aplicado 30 minutos antes del tratamiento.

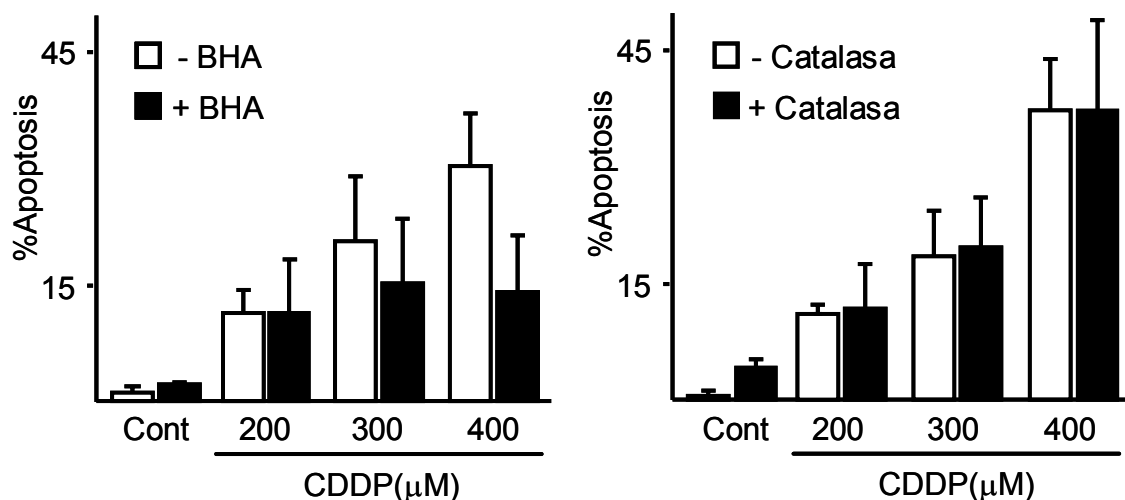


Figura 21. Efecto de antioxidantes en la apoptosis inducida por cisplatino. Frecuencia de apoptosis en células NRK-52E tratadas por 24 horas con las dosis de cisplatino indicadas y células que además han sido pretratadas una hora con BHA (200 μM) o catalasa (500U/ml).

7.3. Contenido de GSH

Se ha descrito que la resistencia que presentan algunas células a la toxicidad de cisplatino está relacionada con un incremento intracelular del contenido de GSH, mientras que un descenso de dichos niveles puede tener el efecto contrario (Zhang y col., 2001; Mansouri y col., 2003). Además se ha demostrado recientemente que el contenido de GSH puede estar bajo el control de proteínas quinasas. Por esta razón, se llevaron a cabo experimentos para determinar los niveles de GSH intracelular en células NRK-52E sometidas a distintas condiciones de tratamiento. Como se puede apreciar en la Figura 22 A, la presencia del inhibidor de p38-MAPK junto con cisplatino, disminuye rápidamente (a las 6h de tratamiento) los niveles de GSH, pero no tiene ningún efecto cuando se administra sólo. La bajada de los niveles de GSH, provocada por la presencia de CDDP + SB, va acompañada de un aumento en la toxicidad inducida por cisplatino, pero no tiene ningún efecto cuando se suministra en ausencia de cisplatino (Figura 14B). Para corroborar el efecto producido por el contenido de GSH intracelular en la toxicidad inducida por cisplatino, se realizaron ensayos con BSO, un inhibidor específico de la síntesis de GSH (γ -glutamylcisteína sintetasa) (Griffith, 1982). Se observa que el descenso progresivo de los niveles de

GSH inducidos por la presencia del inhibidor BSO, no tiene efectos tóxicos en las células, pero la presencia de cisplatino potencia el descenso de GSH producido por BSO y de la misma forma la apoptosis (Figura 22 B). Considerados juntos estos resultados sugieren que la presencia del inhibidor de p38-MAPK potencia la apoptosis provocada por cisplatino mediante un descenso temprano de GSH intracelular.

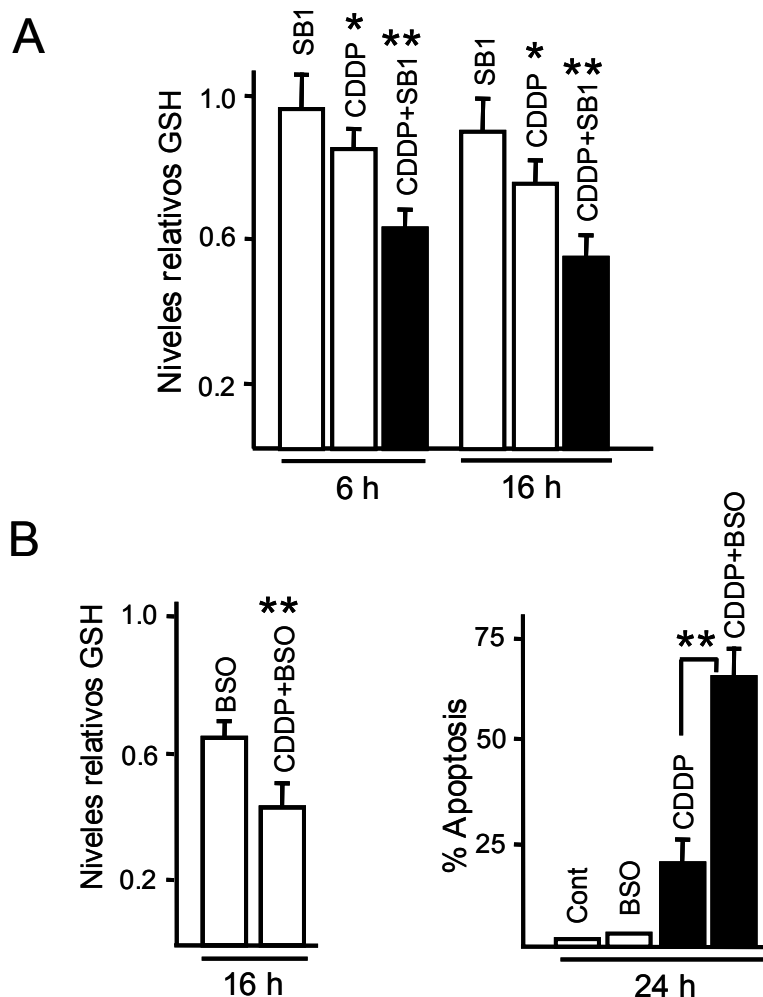


Figura 22. Regulación por p38-MAPK de la apoptosis inducida por cisplatino a través del contenido de glutathione (GSH). A) Contenido relativo de GSH tras los tiempos indicados, en células NRK-52E incubadas con 200 μ M de cisplatino, en ausencia o presencia del inhibidor de p38-MAPK. B) Contenido relativo de GSH, tras 16 horas de tratamiento, en células NRK-52E incubadas con 1mM de BSO, en ausencia o presencia de cisplatino; frecuencia de apoptosis en células tratadas con BSO en ausencia o en presencia de 200 μ M de cisplatino durante 24 horas. Los resultados representan la media \pm S.D. de tres ensayos diferentes.

(* , $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

La modulación de los niveles de GSH, por la presencia de los inhibidores SB o BSO, que presentan estas células cuando son tratadas con arsenito o cloruro de cadmio, responde al mismo patrón de comportamiento que en el caso del tratamiento con cisplatino en que observamos una relación inversa entre niveles de GSH y toxicidad celular (Figura 23 y 9A).

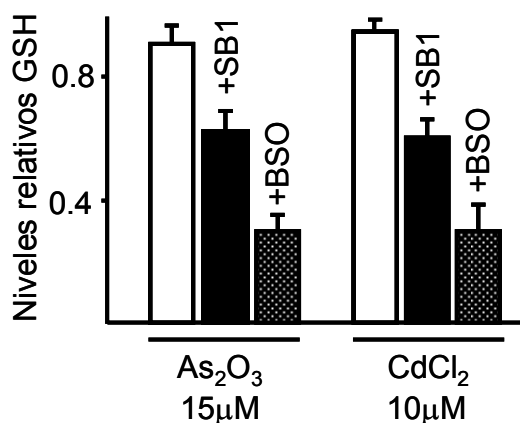


Figura 23. Modificación del contenido de glutathion (GSH) celular, por la presencia de los inhibidores SB1 o BSO con arsenito o cadmio. A) Contenido relativo de GSH tras 16h de tratamiento con 15 μM de As_2O_3 o 10 μM de CdCl_2 en ausencia o en presencia de los inhibidores SB1 o BSO en células NRK-52E. Los resultados representan la media \pm S.D. de tres ensayos diferentes.

7.4. Contenido intracelular de platino y platinación del ADN

Teniendo en cuenta la capacidad destoxificante de glutathion para proteger las células, un aumento de la cantidad de cisplatino, provocaría un consumo mayor de GSH. Además, ya se ha establecido la implicación de proteínas quinasas en el transporte de drogas. En nuestro caso, habiendo descartado la producción de peróxidos, la única causa del descenso de glutathion podría ser un aumento en la cantidad de cisplatino acumulada cuando añadimos el inhibidor de p38-MAPK junto con cisplatino. Ese aumento de la droga en las células produciría una movilización más rápida hacia el núcleo y su unión al DNA desencadenando el proceso apoptótico. Para confirmar esta hipótesis, se han llevado a cabo experimentos para medir el contenido intracelular de cisplatino en ausencia o en presencia del inhibidor SB. Los resultados obtenidos indican que el cotratamiento con el inhibidor SB203580 provoca un progresivo incremento en la acumulación de platino dentro de la célula, detectado a

partir de las 6 horas de tratamiento (Figura 24 A.). La platinación del ADN parece ocurrir de forma rápida ya que a las 6 h ya presenta valores próximos a la saturación (Figura 24 B.). Estos datos sugieren que la inhibición de p38-MAPK potencia la toxicidad inducida por cisplatino en la célula tubular renal mediante el aumento de la unión de cisplatino al ADN, lo cual podría ser explicado en parte por la acumulación intracelular del nefrotóxico.

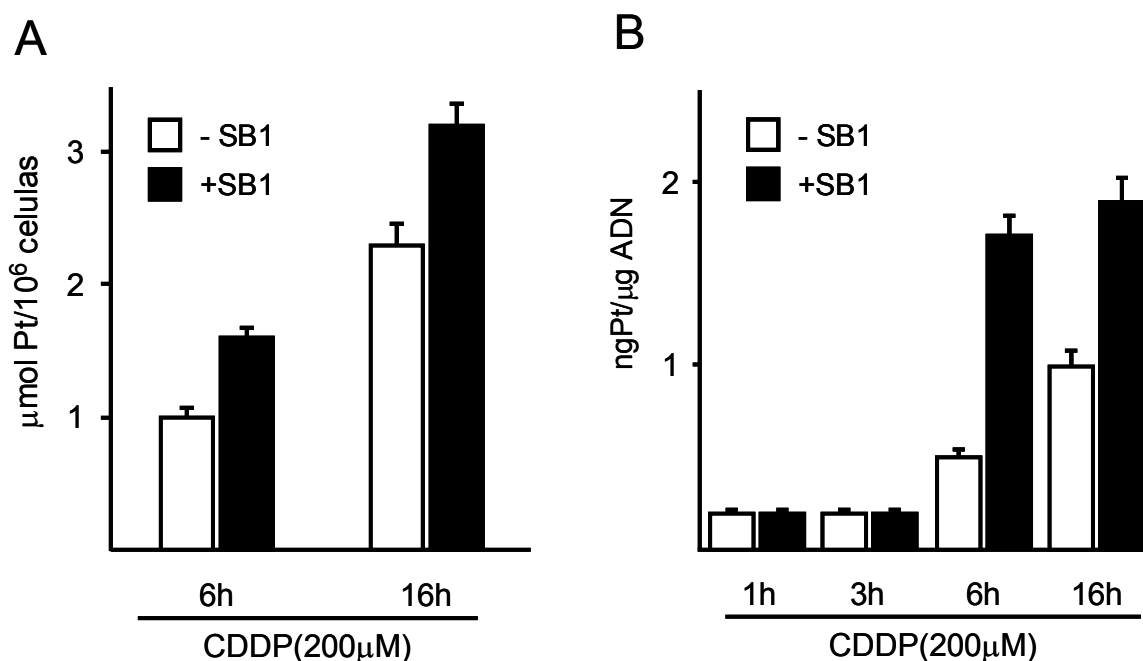


Figura 24. Contenido intracelular de platino y platinación del ADN. La medida se realizó mediante la técnica de TXRF en muestras obtenidas a partir de células NRK-52E tratadas durante los tiempos indicados con 200μM de cisplatino. A) Valores de platino intracelular relativos a las células sin tratar en ausencia o presencia de SB203580. B) La platinación del ADN en ausencia o presencia de SB203580 se expresa en ngPt/μg ADN. Los resultados obtenidos representan la media de dos experimentos ±S.D.

DISCUSIÓN

1. Análisis de las condiciones experimentales

La caracterización de factores que regulan la nefrotoxicidad inducida por tratamientos de quimioterapia, ha sido objeto de múltiples estudio, y ha llevado al conocimiento de los procesos que definen la muerte celular. Las células pueden experimentar muerte programada o apoptosis y/o muerte por necrosis, dependiendo de la intensidad del daño (Lieberthal y col., 1998). La apoptosis, también aparece para controlar la nueva producción celular (Ortiz y col., 1996) requerida cuando el daño es importante y se necesita regenerar y remodelar el tejido del túbulo renal afectado, (Lieberthal y Levine, 1996; Lieberthal y col., 1996; Sheridan y Bonventre, 2000). Las nuevas células pueden ser más sensibles al déficit en factores de supervivencia, contribuyendo a la persistencia o retraso en la recuperación del daño renal. Teniendo en cuenta estas consideraciones, optamos por estudiar los mecanismos que controlan la apoptosis en un modelo de células renales en estado quiescente, para descartar posibles interferencias con señalizaciones de la proliferación celular, y por ser el estado en que se encuentran las células que forman los tejidos. Observamos que estas células son más resistentes al tratamiento que las células proliferantes: mientras que en células confluentes en un 80% se obtenía alrededor de un 30-40% de células apoptóticas, con dosis de 200 μ M de cisplatino durante 24 h, en células quiescentes y en las mismas condiciones se podía apreciar la mitad de apoptosis. Concentraciones superiores a los 200 μ M producen un aumento progresivo de la tasa de células apoptóticas, pero también, la aparición de necrosis celular. Otros autores utilizan dosis mas bajas durante tiempos de exposición más largos (Lieberthal y col., 1996; Lau, 1999; Cummings y Schnellmann, 2002; Park y col., 2002). La sensibilidad que observamos en las células NRK-52E también variaba con el tipo de agente utilizado. De este modo, dosis de arsenito (15 μ M) o cadmio (10 μ M) utilizadas para inducir la misma tasa de apoptosis que cisplatino son 10 o 20 veces más bajas. Peraza (2006) emplea concentraciones inferiores a 10 μ M de arsenito en otro tipo de células de epitelio proximal (HK-2) para inducir apoptosis. Considerando que la sensibilidad para el mismo agente varía con el tipo celular, estudiamos la apoptosis inducida por distintas concentraciones de cisplatino, en diferentes líneas celulares. Observamos que las células de rata, NRK-52E, y las de cerdo, LLC-PK1, presentan la misma sensibilidad frente al cisplatino, sin embargo, las humanas, HK2, y las distales de perro, MDCK, son inducidas a apoptosis con concentraciones mucho más bajas.

2. Elementos implicados en el proceso

Determinaciones preliminares realizadas en células NRK-52E, no pudieron demostrar atenuación del proceso apoptótico tras el empleo del inhibidor específico de caspasa-8 (z-IETD-fmk), ni la rotura de la proteína Bid por caspasa 8. Aunque estos resultados son consistentes con los obtenidos por Park (2002) en células LLC-PK1, una posible y adicional contribución de la ruta extrínseca no debería ser totalmente excluida si tenemos en cuenta publicaciones más recientes donde se observa activación de la caspasa-8 inducida por cisplatino en células NRK-52E y LLC-PK1 (Park y col., 2002; Tsuruya y col., 2003; Yano y col., 2007).

En los estudios realizados de la ruta intrínseca, observamos que el cisplatino causa una disfunción mitocondrial, como indica la reducción del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), y la activación de la ruta mitocondrial como consecuencia del descenso de los niveles de expresión de Bcl-X_L y un aumento correlativo de los de Bax, así como la liberación de citocromo c de la mitocondria al citosol. El descenso en la relación Bcl2/Bax y/o Bcl-X_L/Bax, ha sido descrito como causa que determina la inducción de apoptosis en células renales (Ortiz y col., 2000) y otros autores. En nuestro modelo celular no se detectó la presencia de proteína Bcl2, aunque existen trabajos en células NRK-52E en los que sí se detectan niveles basales de dicha proteína (Lee y col., 2001). Aún así, en diferentes circunstancias, las funciones de supervivencia de Bcl-2 pueden ser suplidas por otra proteína antiapoptótica, Bcl-X_L, (Oltvai y Korsmeyer, 1994; Chao y col., 1995). Por tanto, en nuestra situación, la proteína Bcl-X_L pasaría a ser la única o principal proteína de la familia Bcl2, que asume el papel protector frente al papel proapoptótico de Bax.

En la liberación de citocromo c, pueden coexistir múltiples mecanismos dentro del mismo modelo celular. Así, la liberación del citocromo c inducida por bajas dosis de arsenito (50 μ M), en fibroblastos embrionarios de ratones, era dependiente de Bax/Bak, ya que cuando se utilizaban estas mismas células procedentes de ratones knockout en Bax/Bak se bloqueaba el proceso. Sin embargo, a altas concentraciones de arsenito (alrededor de 200 μ M) la liberación de citocromo c fue causada por un efecto directo del tóxico sobre la mitocondria dando lugar a la inducción del poro de transición mitocondrial (MTP), lo cual ocurre de similar manera en ambos tipos de células: salvajes y carentes de Bax y Bak (Bustamante y col., 2005). Se ha descrito que el cisplatino se puede unir a los fosfolípidos de membrana causando perturbaciones en la estructura de la doble capa, lo que podría afectar a su funcionalidad (Speelmans y col., 1997; Suwalsky y col., 2000), siendo un efecto directo del cisplatino sobre la mitocondria y como consecuencia sobre el descenso del $\Delta\Psi_m$.

Se ha sugerido que, en la apoptosis, la liberación del citocromo c ocurre en un proceso con dos etapas y esto podría explicar el efecto protector de muchas enzimas mitocondriales antioxidantes (Gogvadze y col., 2006). La simple permeabilización de la membrana mitocondrial externa por Bax oligomerizado, no sería suficiente para la liberación del citocromo c, siendo la peroxidación de la cardiolipina el paso esencial para movilizar al citocromo c desde la membrana mitocondrial interna (Ott y col., 2002), y para activar la cascada de caspasas que terminarían el proceso (Petrosillo y col., 2001).

Las caspasas son los principales ejecutores de la ruta apoptótica, siendo la caspasa-3 el principal mediador, por lo que su activación representa un punto clave en la transmisión del programa apoptótico (Hirata y col., 1998). La caspasa 3 activa, tiene varias dianas que incluyen la isoforma δ de la proteína quinasa C (PKC- δ) la cual realiza un papel primordial en la degradación de los componentes celulares y su empaquetamiento en vesículas. Durante la apoptosis, PKC- δ es rota por la caspasa-3 dando lugar a un fragmento catalítico que transfectado a las células es suficiente para inducir apoptosis (Deacon y col., 1997; Li y col., 1999a; Majumder y col., 2000; Denning y col., 2002). Estas son las razones por las que la activación de caspasa-3 y la detección del fragmento catalítico de PKC- δ se utilizan habitualmente como indicadores de inducción de apoptosis. En la apoptosis inducida por cisplatino, en nuestro modelo de células NRK-52E, hemos visto que el aumento en la actividad caspasa 3 y la aparición del fragmento catalítico de PKC- δ coinciden con el aumento del porcentaje de células apoptóticas. También hemos comprobado que la presencia del inhibidor z-VAD-fmk de caspasa 3 reduce un 75% el porcentaje de apoptosis inducido por cisplatino.

3. Regulación por p38-MAPK

La importancia de la activación de MAP quinasas en respuesta al tratamiento con cisplatino, y el desarrollo de resistencias a la droga antitumoral han ido aumentando en los últimos años. Actualmente se considera, que la activación de MAPKs es uno de los componentes mayoritarios que deciden el destino celular en respuesta al cisplatino u otros agentes citotóxicos. Sin embargo, establecer el papel de estas proteínas es complejo, ya que como se ha descrito con ERK y JNK, pueden estar implicadas tanto en la muerte como en la supervivencia celular, según el tipo celular y las condiciones experimentales, mientras que la activación de p38-MAPK por cisplatino se ha relacionado más con muerte celular (Brozovic y Osmak, 2007). Como se ha visto en

algunos modelos de células de túbulo renal, cisplatino causa activación de p38-MAPK (Arany y col., 2004; Ramesh y Brian Reeves, 2006), y su inhibición atenúa la necrosis inducida en ratón (Ramesh 2005). No obstante, nuestros resultados en células quiescentes renales de rata (NRK-52E), indican que cuando cisplatino induce apoptosis, disminuyen los niveles de la forma activa de ERK2 y de p38 sin modificar los de JNK. Por otro lado, cuando se inhibía la activación de ERK o JNK, no se modificaban los niveles detectados de apoptosis, pero sí se modificaban cuando se inhibía la activación de p38. Los resultados obtenidos descartan una posible relación de ERK o JNK con el proceso de apoptosis, y apuntan la posibilidad de que p38 pueda controlarlo negativamente, ya que su inhibición acelera el proceso.

Confirmamos que la desfosforilación de p38-P, que precede la ejecución de la apoptosis, era reforzada con cotratamientos con sus inhibidores; también observamos en células transfectadas con el dominante negativo de MKK6 (no fosforilan p38-MAPK), el mismo efecto sobre la apoptosis. Sin embargo en células transfectadas con el dominante positivo de MKK6 (fosforilan p38-MAPK), observamos el efecto contrario.

Esta relación inversa entre la activación de p38-MAPK y la inducción de apoptosis por cisplatino en células NRK-52E de rata, también era observada en células renales de cerdo, mono, o humanas sometidas a las mismas condiciones experimentales. La inducción de apoptosis en células NRK-52E con otros agentes nefrotóxicos como arsenito o cadmio, causa una respuesta similar a la obtenida con cisplatino. Además, estudiamos que este comportamiento inusual de p38-MAPK, está relacionado con las condiciones experimentales, ya que en células NRK-52E proliferantes, el efecto del cisplatino es el contrario al estudiado en células quiescentes: la activación de p38-MAPK guarda una relación directa con la inducción de apoptosis, y la presencia del inhibidor de p38-MAPK disminuye la apoptosis celular. En cualquier caso, y hasta donde conocemos, es la primera vez que se describe una relación inversa entre la activación de p38-MAPK y la inducción de apoptosis por cisplatino en células de túbulo renal.

Teniendo en cuenta que la proteína de choque térmico Hsp 27 es sustrato de p38 MAPK, se quiso contrastar si se modula de la misma manera cuando cisplatino induce apoptosis. Pero no se detectó la presencia de esta proteína, ni la de la proteína Hsp70 cuando tratamos células NRK-52E o LLC-PK1 con cisplatino o arsenito, pero no ocurría lo mismo con el tratamiento de cadmio. La expresión de Hsp27 ha sido estudiada por Bonham (2003) en células LLC-PK1 y MDCK como respuesta a una exposición prolongada a cadmio, observando un aumento en los niveles de expresión dependiente de la concentración. Sin embargo, un aumento de Hsp70 sólo se detectó a las concentraciones en las que se detecta muerte celular. Por otro lado, los

resultados obtenidos por Leitao (2003) en células LLC-PK1, en condiciones de inducción de muerte celular, no muestran cambios en los niveles de expresión de la forma inducible de Hsp70 pero sí en los niveles de ARNm. También se ha demostrado que el cisplatino puede bloquear la síntesis de proteínas por distintos mecanismos, incluyendo la interacción con el ARNm (Rosenberg y Sato, 1993) previniendo su traducción, reaccionando con los grupos sulfidrilos de las proteínas (Chu, 1994) o inhibiendo la elongación polipeptídica (Heminger y col., 1997; Ljungman y col., 1999). Todo esto explicaría los resultados obtenidos con cisplatino en células NRK-52E y células LLC-PK1. Sin embargo, en otros tipos de células tumorales o normales, se ha descrito una inducción de Hsp70 tras el tratamiento de cisplatino. (Abe y col., 1999; Brozovic y col., 2001; Yamamoto y col., 2001; Jakubowicz-Gil y col., 2002; Ramirez-Camacho y col., 2007).

Para determinar qué elementos de la ruta intrínseca de la apoptosis, se encuentran bajo el control de p38-MAPK, estudiamos la incidencia de su inhibición sobre ellos. La inhibición de p38-MAPK acelera la apoptosis a través de eventos, tales, como la pérdida de $\Delta\Psi_m$, salida de citocromo c de la mitocondria, disminución de los niveles de Bcl-X_L, aumento de los de Bax, y rotura/activación de Bid. Bax es un sustrato de p38-MAPK, y por tanto esta quinasa ha sido involucrada en la regulación de la activación y translocación de Bax a la mitocondria en varios modelos celulares, entre los que se encuentran las células de túbulo proximal renal LLC-PK1 (Kim y col., 2006). Nosotros pudimos ver que la inhibición de p38 no solo aumenta los niveles de Bax, también parece facilitar la translocación de esta proteína a la mitocondria ya que se acelera su desaparición de la fracción citosólica.

Después de la exposición del ADN al daño, o bajo condiciones de estrés, las células muestran un rápido incremento en los niveles de expresión de p53 como consecuencia de su estabilización mediante modificaciones post-transcripcionales (Laptenko y Prives, 2006). Se piensa que la activación de p53 juega un papel importante en la nefrotoxicidad inducida por cadmio por arresto en la progresión del ciclo celular (Xie y Shaikh, 2006). El arresto del ciclo celular dependiente de p53 se ha observado también en la exposición a arsenito (Liu y col., 2003). El estrés oxidativo provoca la activación de WAF1/p1, una diana controlada por p53 y el arresto del ciclo celular (Clement y col., 2001; Kwon y Rho, 2003; Xie y Shaikh, 2006). También varios metales activan factores de transcripción, incluido p53, a través del estrés oxidativo (Valko y col., 2005). Aunque el cadmio puede que no genere especies reactivas de oxígeno directamente, puede disminuir los niveles de glutatión endógenos, inhibir la cadena de transporte electrónico y provocar de esta manera la acumulación de radicales superóxidos (Stohs y Bagchi, 1995; O'Brien y Salacinski, 1998; Robertson y

Orrenius, 2000). El cadmio puede causar peroxidación lipídica en algunos tipos celulares e incrementar los niveles de peróxido de hidrógeno (Koizumi y col., 1996; Szuster-Ciesielska y col., 2000; Ercal y col., 2001). También se produce peróxido de hidrógeno tras la exposición de cadmio en células NRK-52E, de esta manera el estrés oxidativo podría ser uno de los mecanismos responsables para la activación p53 e inducción de WAF/p21 por cadmio (Xie y Shaikh, 2006). Bragado (2007) demuestra la necesidad de la generación de ROS mediada por p53 para activar p38 MAPK como algo esencial en la inducción de apoptosis por cisplatino en células HCT116 de carcinoma de colon. (Yano y col., 2007) describen en células del túbulo renal LLC-PK1 donde se ha inducido nefrotoxicidad con cisplatino, que p53 media la activación de caspasa 2, 8, y 3 relacionadas con apoptosis, mientras que la generación de especies reactivas de oxígeno estaría mayormente implicada en la necrosis. El estrés oxidativo aumentaría la fosforilación de p38 MAPK, y consecuentemente estimularía la producción de TNF- α , lo cual provocaría necrosis tubular (Mishima y col., 2006). La fosforilación en diferentes residuos de serina/treonina es un paso clave en la regulación de p53 en respuesta a una gran variedad de estímulos. Entre las diferentes quinasas capaces de fosforilar p53, p38 MAPK parece liderar la activación de p53, implicándose en la respuesta apoptótica (Huang y col., 1999; Sanchez-Prieto y col., 2000; Perfettini y col., 2005). El estudio de la activación de p53, generación de ROS y su relación con p38 MAPK en nuestro modelo celular nos muestra otros resultados, no observando ni modulación de p53 ni de ROS tras el tratamiento con cisplatino y un inhibidor de p38-MAPK. Se ha descrito que el tratamiento con níquel, en células NRK-52E, (Tsuruya y col.) provoca el descenso de la expresión de proteína Bcl2 sin efecto sobre la expresión de la proteína p53. Las observaciones de ese estudio indican que el arresto de ciclo celular en G2/M ocurre a través de una ruta independiente de p53 y que el acetato de níquel activaría directamente la ruta de señalización mediada por Bcl2 (Lee y col., 2001), por lo que sería posible que nuestra respuesta fuese dependiente de las condiciones de experimentación que provocan daño leve en las células.

Recientemente se ha descrito que el inhibidor específico de p38-MAPK, SB203580, no afecta a la entrada de cisplatino en células inmortalizadas de túbulo proximal de ratón TKPS (Ramesh y Reeves, 2005). Sin embargo, nuestro trabajo muestra que el cotratamiento con SB203580, aumenta la acumulación intracelular de cisplatino y la unión a ADN en células NRK-52E confluentes, una respuesta que podría explicar en parte el aumento de la apoptosis provocada por la inhibición de la quinasa. A la vista de todos estos resultados podemos concluir, razonadamente, que p38 regula, sobretudo, el transporte de cisplatino dentro y fuera de la célula; la

identificación de la diana exacta de esta regulación es una tarea difícil, debido a la gran complejidad y al desconocimiento de la maquinaria de importación/exportación del cisplatino (Siddik, 2003).

Una posible explicación a esta acumulación de cisplatino es que fuese la consecuencia de una deficiente destoxificación por glutathione. Generalmente, GSH es un factor esencial, y probablemente un factor limitante, en la maquinaria de destoxificación basada en el glutathione (Zhang y col., 2001), un proceso que involucra la formación de conjugados de GSH/cisplatino y su extrusión de la célula por la proteína asociada a la resistencia a drogas (MRP). Apoyándonos en esta posibilidad, nuestros experimentos con SB203580 provocaban un descenso en el contenido intracelular de GSH, y que GSH regula la toxicidad del cisplatino, como demuestra el aumento de la apoptosis inducida por cisplatino en células cotratadas con BSO. Aunque esto no excluye que la proteína quinasa pueda también regular directamente, el transporte por mecanismos independientes de GSH: la activación de PKC por ésteres de forbol, potencia la acumulación de cisplatino en células HeLa estimulando la tasa de entrada de la droga (Basu y Evans, 1994). Además, el hecho de que en nuestros experimentos, el aumento de la platinación del ADN sea más alto que el aumento en el contenido intracelular de platino, sugiere que p38 podría directamente regular la formación de aductos de cisplatino-ADN, independientemente de la disponibilidad de la droga.

En resumen, el estudio presente indica que el cisplatino regula a la baja la activación/ fosforilación de p38 en células quiescentes, confluentes/privadas de suero, de epitelio tubular renal, lo cual podría explicar, al menos en parte, la apoptosis inducida en este modelo celular. La bajada de los niveles de glutathione, y el aumento de cisplatino acumulado por la célula y el unido a ADN, podría explicar esta inusual acción regulatoria de p38-MAPK.

CONCLUSIONES

- El porcentaje de apoptosis inducido en células NRK-52E quiescentes (más resistentes al tratamiento que las células en crecimiento exponencial), es dependiente de la concentración de cisplatino, arsenito o cadmio utilizado, y es alrededor de las 16 h cuando se hace patente el proceso.
- p38-MAPK regula negativamente, el proceso de apoptosis inducido por cisplatino en células quiescentes de epitelio proximal de rata (NRK-52E), cerdo (LLC-PK1), humanas (HK-2), y distal de perro (MDCK).
- p38-MAPK regula la apoptosis inducida por As_2O_3 o CdCl_2 , de la misma manera que cisplatino, en células NRK-52E quiescentes.
- Sin embargo, p38-MAPK regula positivamente la apoptosis inducida por cisplatino en células proliferantes.
- La modulación por p38-MAPK precede la ejecución de la apoptosis, y su inhibición acelera el proceso a través de la ruta mitocondrial: disipación del potencial de membrana mitocondrial y salida de citocromo c, bajada de los niveles de Bcl-X_L, subida de los de Bax, y activación de Bid.
- La inhibición de p38-MAPK potencia la apoptosis inducida por cisplatino al disminuir la detoxificación celular debido al descenso de los niveles de glutatión que provoca un aumento en la acumulación del tóxico y en su unión al ADN.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, M.K., Kahle, K.T., Saelzler, M.P., Orth, K., Dixon, J.E., y Rosner, M.R. (2001). ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *J Biol Chem* 276, 21272-21279.
- Abe, T., Gotoh, S., y Higashi, K. (1999). Higher induction of heat shock protein 72 by heat stress in cisplatin-resistant than in cisplatin-sensitive cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1445, 123-133.
- Adams, J.M., y Cory, S. (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 14, 715-720.
- Adrain, C., y Martin, S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 26, 390-397.
- Akaza, H., Saijo, N., Aiba, K., Isonishi, S., Ohashi, Y., Kawai, K., Konishi, T., Saeki, T., Sone, S., Tsukagoshi, S., Tsuruo, T., Noguchi, S., Miki, T., Mikami, O., Smith, M., Hocht-Bosses, G., y Stribling, D. (2001). [Platinum compounds in cancer therapy--past, present, and future]. *Gan To Kagaku Ryoho* 28, 625-635.
- Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnhart, B.C., Murmann, A.E., Burkhardt, J.K., y Peter, M.E. (2002). Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 22, 207-220.
- Ambrosino, C., y Nebreda, A.R. (2001). Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biol Cell* 93, 47-51.
- Anderson, M.E., Naganuma, A., y Meister, A. (1990). Protection against cisplatin toxicity by administration of glutathione ester. *Faseb J* 4, 3251-3255.
- Aquila, H., Misra, D., Eulitz, M., y Klingenberg, M. (1982). Complete amino acid sequence of the ADP/ATP carrier from beef heart mitochondria. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 363, 345-349.
- Arany, I., Megyesi, J.K., Kaneto, H., Price, P.M., y Safirstein, R.L. (2004). Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F543-549.
- Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J.C., Cecconi, F., y Youle, R.J. (2003). Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J* 22, 4385-4399.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Laughton, M.J., Quinlan, G.J., y Gutteridge, J.M. (1989). The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochem J* 258, 617-620.

Arya, R., Mallik, M., y Lakhota, S.C. (2007). Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci* 32, 595-610.

Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., y Korsmeyer, S.J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41, 899-906.

Baldew, G.S., van den Hamer, C.J., Los, G., Vermeulen, N.P., de Goeij, J.J., y McVie, J.G. (1989). Selenium-induced protection against cis-diamminedichloroplatinum(II) nephrotoxicity in mice and rats. *Cancer Res* 49, 3020-3023.

Barr, P.J., y Tomei, L.D. (1994). Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology (N Y)* 12, 487-493.

Barros, L.F., Hermosilla, T., y Castro, J. (2001a). Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130, 401-409.

Barros, L.F., Stutzin, A., Calixto, A., Catalan, M., Castro, J., Hetz, C., y Hermosilla, T. (2001b). Nonselective cation channels as effectors of free radical-induced rat liver cell necrosis. *Hepatology* 33, 114-122.

Basanez, G., Sharpe, J.C., Galanis, J., Brandt, T.B., Hardwick, J.M., y Zimmerberg, J. (2002). Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem* 277, 49360-49365.

Basinger, M.A., Jones, M.M., y Holscher, M.A. (1990). L-methionine antagonism of cis-platinum nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 103, 1-15.

Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C., y Thomas, M. (1983). Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 130, 1910-1917.

Basu, A., y Evans, R.W. (1994). Comparison of effects of growth factors and protein kinase C activators on cellular sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Int J Cancer* 58, 587-591.

Bellon, S., Fitzgibbon, M.J., Fox, T., Hsiao, H.M., y Wilson, K.P. (1999). The structure of phosphorylated p38gamma is monomeric and reveals a conserved activation-loop conformation. *Structure* 7, 1057-1065.

Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H.F., y Marshall, C.J. (1998). Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol* 8, 1049-1057.

Benjamin, I.J., y McMillan, D.R. (1998). Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 83, 117-132.

Benz, R. (1994). Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta* 1197, 167-196.

Bernal, S.D., Speak, J.A., Boeheim, K., Dreyfuss, A.I., Wright, J.E., Teicher, B.A., Rosowsky, A., Tsao, S.W., y Wong, Y.C. (1990). Reduced membrane protein associated with resistance of human squamous carcinoma cells to methotrexate and cis-platinum. *Mol Cell Biochem* 95, 61-70.

Bernardi, P. (1996). The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim Biophys Acta* 1275, 5-9.

Berns, J.S., y Ford, P.A. (1997). Renal toxicities of antineoplastic drugs and bone marrow transplantation. *Semin Nephrol* 17, 54-66.

Berra, E., Diaz-Meco, M.T., y Moscat, J. (1998). The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 273, 10792-10797.

Berra, E., Municio, M.M., Sanz, L., Frutos, S., Diaz-Meco, M.T., y Moscat, J. (1997). Positioning atypical protein kinase C isoforms in the UV-induced apoptotic signaling cascade. *Mol Cell Biol* 17, 4346-4354.

Beutner, G., Ruck, A., Riede, B., y Brdiczka, D. (1998). Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* 1368, 7-18.

Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G., y Thompson, C.B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.

Boise, L.H., y Thompson, C.B. (1997). Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3759-3764.

Bonham, R.T., Fine, M.R., Pollock, F.M., y Shelden, E.A. (2003). Hsp27, Hsp70, and metallothionein in MDCK and LLC-PK1 renal epithelial cells: effects of prolonged exposure to cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 191, 63-73.

Brady, H.R., Kone, B.C., Stromski, M.E., Zeidel, M.L., Giebisch, G., y Gullans, S.R. (1990). Mitochondrial injury: an early event in cisplatin toxicity to renal proximal tubules. *Am J Physiol* 258, F1181-1187.

Brady, H.R., Zeidel, M.L., Kone, B.C., Giebisch, G., y Gullans, S.R. (1993). Differential actions of cisplatin on renal proximal tubule and inner medullary collecting duct cells. *J Pharmacol Exp Ther* 265, 1421-1428.

Bragado, P., Armesilla, A., Silva, A., y Porras, A. (2007). Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis* 12, 1733-1742.

Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J.J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R.A., y Davis, R.J. (2003). Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev* 17, 1969-1978.

Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., y Gustin, M.C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259, 1760-1763.

Brookes, P.S., Levonen, A.L., Shiva, S., Sarti, P., y Darley-Usmar, V.M. (2002). Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 33, 755-764.

Brozovic, A., y Osmak, M. (2007). Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Lett* 251, 1-16.

Brozovic, A., Simaga, S., y Osmak, M. (2001). Induction of heat shock protein 70 in drug-resistant cells by anticancer drugs and hyperthermia. *Neoplasma* 48, 99-103.

Bulavin, D.V., Amundson, S.A., y Fornace, A.J. (2002). p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony. *Curr Opin Genet Dev* 12, 92-97.

Bulavin, D.V., Phillips, C., Nannenga, B., Timofeev, O., Donehower, L.A., Anderson, C.W., Appella, E., y Fornace, A.J., Jr. (2004). Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet* 36, 343-350.

Burdon, R.H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 18, 775-794.

Bustamante, J., Nutt, L., Orrenius, S., y Gogvadze, V. (2005). Arsenic stimulates release of cytochrome c from isolated mitochondria via induction of mitochondrial permeability transition. *Toxicol Appl Pharmacol* 207, 110-116.

Cahill, M.A., Peter, M.E., Kischkel, F.C., Chinnaiyan, A.M., Dixit, V.M., Krammer, P.H., y Nordheim, A. (1996). CD95 (APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE-like proteases. *Oncogene* 13, 2087-2096.

Cai, J., Yang, J., y Jones, D.P. (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1366, 139-149.

Cain, K., Bratton, S.B., y Cohen, G.M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84, 203-214.

Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H., y Goldsmith, E.J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90, 859-869.

Cardone, M.H., Salvesen, G.S., Widmann, C., Johnson, G., y Frisch, S.M. (1997). The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 90, 315-323.

Carmody, R.J., McGowan, A.J., y Cotter, T.G. (1999). Reactive oxygen species as mediators of photoreceptor apoptosis in vitro. *Exp Cell Res* 248, 520-530.

Clement, A., Henrion-Caude, A., Besnard, V., y Corroyer, S. (2001). Role of cyclins in epithelial response to oxidants. *Am J Respir Crit Care Med* 164, S81-84.

Cobb, M.H. (1999). MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 71, 479-500.

Cohen, D.M. (1996). Urea-inducible Egr-1 transcription in renal inner medullary collecting duct (mIMCD3) cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11242-11247.

Cole, J.A. (1999). Parathyroid hormone activates mitogen-activated protein kinase in opossum kidney cells. *Endocrinology* 140, 5771-5779.

Coluccia, M., y Natile, G. (2007). Trans-platinum complexes in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 7, 111-123.

Concannon, C.G., Gorman, A.M., y Samali, A. (2003). On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 8, 61-70.

Coroneos, E., Wang, Y., Panuska, J.R., Templeton, D.J., y Kester, M. (1996). Sphingolipid metabolites differentially regulate extracellular signal-regulated kinase and stress-activated protein kinase cascades. *Biochem J* 316 (Pt 1), 13-17.

Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., y Gutkind, J.S. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81, 1137-1146.

Cotman, C.W., y Anderson, A.J. (1995). A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 10, 19-45.

Coulombe, P., y Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1376-1387.

Court, N.W., dos Remedios, C.G., Cordell, J., y Bogoyevitch, M.A. (2002). Cardiac expression and subcellular localization of the p38 mitogen-activated protein kinase member, stress-activated protein kinase-3 (SAPK3). *J Mol Cell Cardiol* 34, 413-426.

Crissman, H.A., y Steinkamp, J.A. (1973). Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J Cell Biol* 59, 766-771.

Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 (Pt 2), 233-249.

Cross, A.R., y Jones, O.T. (1991). Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta* 1057, 281-298.

Cuenda, A., Cohen, P., Buee-Scherrer, V., y Goedert, M. (1997). Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *Embo J* 16, 295-305.

Cuenda, A., y Dorow, D.S. (1998). Differential activation of stress-activated protein kinase kinases SKK4/MKK7 and SKK1/MKK4 by the mixed-lineage kinase-2 and mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) kinase-1. *Biochem J* 333 (Pt 1), 11-15.

Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y.N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T.F., Young, P.R., y Lee, J.C. (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 364, 229-233.

Cummings, B.S., y Schnellmann, R.G. (2002). Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 8-17.

Chance, B., Sies, H., y Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605.

Chandra, J., Samali, A., y Orrenius, S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29, 323-333.

Chang, S.H., Phelps, P.C., Berezsky, I.K., Ebersberger, M.L., Jr., y Trump, B.F. (2000). Studies on the mechanisms and kinetics of apoptosis induced by microinjection of cytochrome c in rat kidney tubule epithelial cells (NRK-52E). *Am J Pathol* 156, 637-649.

Chao, D.T., Linette, G.P., Boise, L.H., White, L.S., Thompson, C.B., y Korsmeyer, S.J. (1995). Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. *J Exp Med* 182, 821-828.

Chatterjee, S., Shi, W.Y., Wilson, P., y Mazumdar, A. (1996). Role of lactosylceramide and MAP kinase in the proliferation of proximal tubular cells in human polycystic kidney disease. *J Lipid Res* 37, 1334-1344.

Chen, G.Q., Shi, X.G., Tang, W., Xiong, S.M., Zhu, J., Cai, X., Han, Z.G., Ni, J.H., Shi, G.Y., Jia, P.M., Liu, M.M., He, K.L., Niu, C., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T.D., Paul, P., Naoe, T., Kitamura, K., Miller, W., Waxman, S., Wang, Z.Y., de The, H., Chen, S.J., y Chen, Z. (1997). Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* 89, 3345-3353.

Chen, Y.R., y Tan, T.H. (1998). Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 17, 173-178.

Chini, E.N., Choi, E., Grande, J.P., Burnett, J.C., y Dousa, T.P. (1995). Adrenomedullin suppresses mitogenesis in rat mesangial cells via cAMP pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 868-873.

Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., y Green, D.R. (2006). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 13, 1396-1402.

Choudhury, G.G., Karamitsos, C., Hernandez, J., Gentilini, A., Bardgett, J., y Abboud, H.E. (1997). PI-3-kinase and MAPK regulate mesangial cell proliferation and migration in response to PDGF. *Am J Physiol* 273, F931-938.

Chu, G. (1994). Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J Biol Chem* 269, 787-790.

Danial, N.N., y Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.

Dashti, S.R., Efimova, T., y Eckert, R.L. (2001). MEK7-dependent activation of p38 MAP kinase in keratinocytes. *J Biol Chem* 276, 8059-8063.

Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M.C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., y Kroemer, G. (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J* 14, 729-739.

de Larco, J.E., y Todaro, G.J. (1978). Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *J Cell Physiol* 94, 335-342.

Deacon, E.M., Pongracz, J., Griffiths, G., y Lord, J.M. (1997). Isoenzymes of protein kinase C: differential involvement in apoptosis and pathogenesis. *Mol Pathol* 50, 124-131.

Deacon, K., Mistry, P., Chernoff, J., Blank, J.L., y Patel, R. (2003). p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest. *Mol Biol Cell* 14, 2071-2087.

Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M., y Alessi, D.R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J* 17, 4426-4441.

del Bello, B., Paolicchi, A., Comporti, M., Pompella, A., y Maellaro, E. (1999). Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *Faseb J* 13, 69-79.

Denning, M.F., Wang, Y., Tibudan, S., Alkan, S., Nickoloff, B.J., y Qin, J.Z. (2002). Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase C. *Cell Death Differ* 9, 40-52.

Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J., y Davis, R.J. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267, 682-685.

Desagher, S., y Martinou, J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10, 369-377.

Deuchars, K.L., y Ling, V. (1989). P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Semin Oncol* 16, 156-165.

Dobyan, D.C., Levi, J., Jacobs, C., Kosek, J., y Weiner, M.W. (1980). Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: II. Morphologic observations. *J Pharmacol Exp Ther* 213, 551-556.

Doza, Y.N., Cuenda, A., Thomas, G.M., Cohen, P., y Nebreda, A.R. (1995). Activation of the MAP kinase homologue RK requires the phosphorylation of Thr-180 and Tyr-182 and both residues are phosphorylated in chemically stressed KB cells. *FEBS Lett* 364, 223-228.

Duckett, D.R., Bronstein, S.M., Taya, Y., y Modrich, P. (1999). hMutSalph- and hMutLalpha-dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12384-12388.

Eastman, A., y Barry, M.A. (1987). Interaction of trans-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation of monofunctional adducts and their reaction with glutathione. *Biochemistry* 26, 3303-3307.

Eaton, D.L., y Bammler, T.K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci* 49, 156-164.

Eder, J. (1997). Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 signalling: do MAPKK kinases connect it all? *Trends Pharmacol Sci* 18, 319-322.

Eguchi, Y., Shimizu, S., y Tsujimoto, Y. (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57, 1835-1840.

Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., Park, S.M., Holleran, A.L., Murphy, A.N., Fiskum, G., Kane, D.J., Testa, M.P., Kayalar, C., y Bredesen, D.E. (1996). Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. *J Neurochem* 67, 1259-1267.

Ellis, J. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328, 378-379.

Enslen, H., Raingeaud, J., y Davis, R.J. (1998). Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* 273, 1741-1748.

Ercal, N., Gurer-Orhan, H., y Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 1, 529-539.

Esposti, M.D. (2002). Lipids, cardiolipin and apoptosis: a greasy licence to kill. *Cell Death Differ* 9, 234-236.

Esposti, M.D., Erler, J.T., Hickman, J.A., y Dive, C. (2001). Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity. *Mol Cell Biol* 21, 7268-7276.

Eyers, P.A., Craxton, M., Morrice, N., Cohen, P., y Goedert, M. (1998). Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution. *Chem Biol* 5, 321-328.

Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., y Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-2216.

Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G., y Alnemri, E.S. (1996). In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7464-7469.

Fernandez-Checa, J.C., y Kaplowitz, N. (1990). The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Anal Biochem* 190, 212-219.

Filippovich, I., Sorokina, N., Khanna, K.K., y Lavin, M.F. (1994). Butyrate induced apoptosis in lymphoid cells preceded by transient over-expression of HSP70 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 198, 257-265.

Fischer, U., Janicke, R.U., y Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10, 76-100.

Florea, A.M., y Busselberg, D. (2006). Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *Biometals* 19, 419-427.

Foletta, V.C., Segal, D.H., y Cohen, D.R. (1998). Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol* 63, 139-152.

Foyouzi-Youssefi, R., Arnaudeau, S., Borner, C., Kelley, W.L., Tschopp, J., Lew, D.P., Demarex, N., y Krause, K.H. (2000). Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5723-5728.

France-Lanord, V., Brugg, B., Michel, P.P., Agid, Y., y Ruberg, M. (1997). Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *J Neurochem* 69, 1612-1621.

Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., y Saklatvala, J. (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78, 1039-1049.

Fukunaga, R., y Hunter, T. (1997). MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *Embo J* 16, 1921-1933.

Gabai, V.L., Yaglom, J.A., Volloch, V., Meriin, A.B., Force, T., Koutroumanis, M., Massie, B., Mosser, D.D., y Sherman, M.Y. (2000). Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death. *Mol Cell Biol* 20, 6826-6836.

Galan, A., Garcia-Bermejo, M.L., Troyano, A., Vilaboa, N.E., de Blas, E., Kazanietz, M.G., y Aller, P. (2000). Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells. *J Biol Chem* 275, 11418-11424.

Garrington, T.P., y Johnson, G.L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11, 211-218.

Gately, D.P., y Howell, S.B. (1993). Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 67, 1171-1176.

Gaush, C.R., Hard, W.L., y Smith, T.F. (1966). Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc Soc Exp Biol Med* 122, 931-935.

Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R.J., Luo, Y., y Han, J. (2002). MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 295, 1291-1294.

Ge, B., Xiong, X., Jing, Q., Mosley, J.L., Filose, A., Bian, D., Huang, S., y Han, J. (2003). TAB1beta (transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1-binding protein 1beta), a novel splicing variant of TAB1 that interacts with p38alpha but not TAK1. *J Biol Chem* 278, 2286-2293.

Geum, D., Son, G.H., y Kim, K. (2002). Phosphorylation-dependent cellular localization and thermoprotective role of heat shock protein 25 in hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem* 277, 19913-19921.

Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R.V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W., y Kufe, D. (1996). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Exp Med* 184, 2399-2404.

Glogowski, E.A., Tsiani, E., Zhou, X., Fantus, I.G., y Whiteside, C. (1999). High glucose alters the response of mesangial cell protein kinase C isoforms to endothelin-1. *Kidney Int* 55, 486-499.

Gobe, G.C., y Axelsen, R.A. (1987). Genesis of renal tubular atrophy in experimental hydronephrosis in the rat. Role of apoptosis. *Lab Invest* 56, 273-281.

Gobe, G.C., Axelsen, R.A., y Searle, J.W. (1990). Cellular events in experimental unilateral ischemic renal atrophy and in regeneration after contralateral nephrectomy. *Lab Invest* 63, 770-779.

Goering, P.L., Aposhian, H.V., Mass, M.J., Cebrian, M., Beck, B.D., y Waalkes, M.P. (1999). The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. *Toxicol Sci* 49, 5-14.

Gogvadze, V., Orrenius, S., y Zhivotovsky, B. (2006). Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1757, 639-647.

Gogvadze, V., Robertson, J.D., Zhivotovsky, B., y Orrenius, S. (2001). Cytochrome c release occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms that are regulated by Bax. *J Biol Chem* 276, 19066-19071.

Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C., y Perez, J.M. (2001). Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 59, 657-663.

Goppelt-Struebe, M., Fickel, S., y Reiser, C.O. (2000). The platelet-derived-growth-factor receptor, not the epidermal-growth-factor receptor, is used by lysophosphatidic acid to activate p42/44 mitogen-activated protein kinase and to induce prostaglandin G/H synthase-2 in mesangial cells. *Biochem J* 345 Pt 2, 217-224.

Gorman, A., McGowan, A., y Cotter, T.G. (1997). Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. *FEBS Lett* 404, 27-33.

Green, D.R., y Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.

Grethe, S., Ares, M.P., Andersson, T., y Porn-Ares, M.I. (2004). p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x(L). *Exp Cell Res* 298, 632-642.

Grewal, J.S., Mukhin, Y.V., Garnovskaya, M.N., Raymond, J.R., y Greene, E.L. (1999). Serotonin 5-HT_{2A} receptor induces TGF- β 1 expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals. *Am J Physiol* 276, F922-930.

Griffith, O.W. (1982). Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem* 257, 13704-13712.

Griffith, O.W., y Meister, A. (1979). Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* 254, 7558-7560.

Grimm, S., y Brdiczka, D. (2007). The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* 12, 841-855.

Groom, L.A., Sneddon, A.A., Alessi, D.R., Dowd, S., y Keyse, S.M. (1996). Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *Embo J* 15, 3621-3632.

Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C., y Korsmeyer, S.J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J* 17, 3878-3885.

Gross, A., McDonnell, J.M., y Korsmeyer, S.J. (1999a). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911.

Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., y Korsmeyer, S.J. (1999b). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 274, 1156-1163.

Guenal, I., Sidoti-de Fraisse, C., Gaumer, S., y Mignotte, B. (1997). Bcl-2 and Hsp27 act at different levels to suppress programmed cell death. *Oncogene* 15, 347-360.

Gum, R.J., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Wang, Z., Bower, M.J., Lee, J.C., Adams, J.L., Livi, G.P., Goldsmith, E.J., y Young, P.R. (1998). Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket. *J Biol Chem* 273, 15605-15610.

Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B., y Davis, R.J. (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267, 389-393.

Gwinn, M.R., y Vallyathan, V. (2006). Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 9, 27-39.

Hale, K.K., Trollinger, D., Rihaneck, M., y Manthey, C.L. (1999). Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol* 162, 4246-4252.

- Hampton, M.B., y Orrenius, S. (1997). Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* 414, 552-556.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., y Ulevitch, R.J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808-811.
- Hanahan, D., y Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hannemann, J., y Baumann, K. (1988). Cisplatin-induced lipid peroxidation and decrease of gluconeogenesis in rat kidney cortex: different effects of antioxidants and radical scavengers. *Toxicology* 51, 119-132.
- Hart, B.A., Lee, C.H., Shukla, G.S., Shukla, A., Osier, M., Eneman, J.D., y Chiu, J.F. (1999). Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology* 133, 43-58.
- Hazzalin, C.A., Cano, E., Cuenda, A., Barratt, M.J., Cohen, P., y Mahadevan, L.C. (1996). p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr Biol* 6, 1028-1031.
- He, L., y Fox, M.H. (1997). Variation of heat shock protein 70 through the cell cycle in HL-60 cells and its relationship to apoptosis. *Exp Cell Res* 232, 64-71.
- Heminger, K.A., Hartson, S.D., Rogers, J., y Matts, R.L. (1997). Cisplatin inhibits protein synthesis in rabbit reticulocyte lysate by causing an arrest in elongation. *Arch Biochem Biophys* 344, 200-207.
- Henkart, P.A. (1996). ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death? *Immunity* 4, 195-201.
- Herrera, B., Alvarez, A.M., Sanchez, A., Fernandez, M., Roncero, C., Benito, M., y Fabregat, I. (2001). Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *Faseb J* 15, 741-751.
- Hickman, J.A. (1992). Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* 11, 121-139.
- Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K., y Sasada, M. (1998). Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med* 187, 587-600.
- Holmgren, A. (2000). Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid Redox Signal* 2, 811-820.

Hsu, Y.T., Wolter, K.G., y Youle, R.J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3668-3672.

Hsu, Y.T., y Youle, R.J. (1998). Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* 273, 10777-10783.

Huang, C., Ma, W.Y., Maxiner, A., Sun, Y., y Dong, Z. (1999). p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem* 274, 12229-12235.

Huang, R.P., Wu, J.X., Fan, Y., y Adamson, E.D. (1996). UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J Cell Biol* 133, 211-220.

Huang, S., Jiang, Y., Li, Z., Nishida, E., Mathias, P., Lin, S., Ulevitch, R.J., Nemerow, G.R., y Han, J. (1997). Apoptosis signaling pathway in T cells is composed of ICE/Ced-3 family proteases and MAP kinase kinase 6b. *Immunity* 6, 739-749.

Hull, R.N., Cherry, W.R., y Weaver, G.W. (1976). The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro* 12, 670-677.

Huot, J., Houle, F., Marceau, F., y Landry, J. (1997). Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res* 80, 383-392.

Huot, J., Houle, F., Rousseau, S., Deschesnes, R.G., Shah, G.M., y Landry, J. (1998). SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 143, 1361-1373.

Inselmann, G., Blohmer, A., Kottny, W., Nellessen, U., Hanel, H., y Heidemann, H.T. (1995). Modification of cisplatin-induced renal p-aminohippurate uptake alteration and lipid peroxidation by thiols, Ginkgo biloba extract, deferoxamine and torbafylline. *Nephron* 70, 425-429.

Ishido, M., Homma, S.T., Leung, P.S., y Tohyama, C. (1995). Cadmium-induced DNA fragmentation is inhibitable by zinc in porcine kidney LLC-PK1 cells. *Life Sci* 56, PL351-356.

Jackson, J.R., Bolognese, B., Hillegass, L., Kassis, S., Adams, J., Griswold, D.E., y Winkler, J.D. (1998). Pharmacological effects of SB 22025, a selective inhibitor of P38 mitogen-activated protein kinase, in angiogenesis and chronic inflammatory disease models. *J Pharmacol Exp Ther* 284, 687-692.

Jacobson, M.D., y Raff, M.C. (1995). Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 374, 814-816.

Jakubowicz-Gil, J., Paduch, R., Gawron, A., y Kandefer-Szerszen, M. (2002). The effect of cisplatin, etoposide and quercetin on Hsp72 expression. *Pol J Pathol* 53, 133-137.

Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J.A., Lin, S., y Han, J. (1996). Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 271, 17920-17926.

Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G., y Penninger, J.M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.

Juo, P., Kuo, C.J., Reynolds, S.E., Konz, R.F., Raingeaud, J., Davis, R.J., Biemann, H.P., y Blenis, J. (1997). Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. *Mol Cell Biol* 17, 24-35.

Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., y Reed, J.C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4997-5002.

Kamata, H., y Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11, 1-14.

Kane, D.J., Sarafian, T.A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Ord, T., y Bredesen, D.E. (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262, 1274-1277.

Karin, M., Liu, Z., y Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 240-246.

Kawai, K., Kamatani, N., Georges, E., y Ling, V. (1990). Identification of a membrane glycoprotein overexpressed in murine lymphoma sublines resistant to cis-diamminedichloroplatinum(II). *J Biol Chem* 265, 13137-13142.

Ke, N., Godzik, A., y Reed, J.C. (2001). Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem* 276, 12481-12484.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., y Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

Keyse, S.M. (1995). An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta* 1265, 152-160.

Keyse, S.M. (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* 12, 186-192.

Kim, B.J., Ryu, S.W., y Song, B.J. (2006). JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 281, 21256-21265.

Kinington, K.K., Oberley, T.D., Lin, S., Mattingly, C.A., y St Clair, D.K. (1999). Overexpression of manganese superoxide dismutase protects against mitochondrial-initiated poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell death. *Faseb J* 13, 1601-1610.

Kitanaka, C., y Kuchino, Y. (1999). Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 6, 508-515.

Kleevernic, I.V., Stafford, M.J., Morrice, N., Pegg, M., Morton, S., y Cohen, P. (2006). Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8. *Biochem J* 394, 365-373.

Klingenberg, M. (1980). The ADP-ATP translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport. *J Membr Biol* 56, 97-105.

Koepsell, H., Busch, A., Gorboulev, V., y Arndt, P. (1998). Structure and Function of Renal Organic Cation Transporters. *News Physiol Sci* 13, 11-16.

Koizumi, T., Shirakura, H., Kumagai, H., Tatsumoto, H., y Suzuki, K.T. (1996). Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium-induced active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane. *Toxicology* 114, 125-134.

Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., y Craig, R.W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3516-3520.

Kramer, R.M., Roberts, E.F., Um, S.L., Borsch-Haubold, A.G., Watson, S.P., Fisher, M.J., y Jakubowski, J.A. (1996). p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that

proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J Biol Chem* 271, 27723-27729.

Kroemer, G. (1997). Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ* 4, 443-456.

Kroemer, G., Zamzami, N., y Susin, S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18, 44-51.

Kudla, G., Montessuit, S., Eskes, R., Berrier, C., Martinou, J.C., Ghazi, A., y Antonsson, B. (2000). The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment. *J Biol Chem* 275, 22713-22718.

Kuhlmann, M.K., Horsch, E., Burkhardt, G., Wagner, M., y Kohler, H. (1998). Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. *Arch Toxicol* 72, 536-540.

Kumar, S., McDonnell, P.C., Gum, R.J., Hand, A.T., Lee, J.C., y Young, P.R. (1997). Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* 235, 533-538.

Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R., y Newmeyer, D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331-342.

Kuwana, T., y Newmeyer, D.D. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 15, 691-699.

Kwon, J.A., y Rho, H.M. (2003). Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral core protein (HBc) in human liver cells. *Biol Chem* 384, 203-212.

Kyriakis, J.M., y Avruch, J. (1996). Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* 18, 567-577.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lancaster, J.R., Jr., Laster, S.M., y Gooding, L.R. (1989). Inhibition of target cell mitochondrial electron transfer by tumor necrosis factor. *FEBS Lett* 248, 169-174.

Laptenko, O., y Prives, C. (2006). Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ* 13, 951-961.

Lau, A.H. (1999). Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury. *Kidney Int* 56, 1295-1298.

Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., y Garrido, C. (2005). Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 24, 5137-5148.

Lavoie, J.N., Nguyen, M., Marcellus, R.C., Branton, P.E., y Shore, G.C. (1998). E4orf4, a novel adenovirus death factor that induces p53-independent apoptosis by a pathway that is not inhibited by zVAD-fmk. *J Cell Biol* 140, 637-645.

Lechner, C., Zahalka, M.A., Giot, J.F., Moller, N.P., y Ullrich, A. (1996). ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4355-4359.

Ledda-Columbano, G.M., Columbano, A., Coni, P., Faa, G., y Pani, P. (1989). Cell deletion by apoptosis during regression of renal hyperplasia. *Am J Pathol* 135, 657-662.

Ledda-Columbano, G.M., Coni, P., Curto, M., Giacomini, L., Faa, G., Oliverio, S., Piacentini, M., y Columbano, A. (1991). Induction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide. *Am J Pathol* 139, 1099-1109.

Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., y et al. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739-746.

Lee, L.F., Li, G., Templeton, D.J., y Ting, J.P. (1998). Paclitaxel (Taxol)-induced gene expression and cell death are both mediated by the activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK). *J Biol Chem* 273, 28253-28260.

Lee, S.H., Choi, J.G., y Cho, M.H. (2001). Apoptosis, bcl2 expression, and cell cycle analyses in nickel(II)-treated normal rat kidney cells. *J Korean Med Sci* 16, 165-168.

Leist, M., y Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598.

Leitao, A.A., Leite, C.A., Santos, B.C., y Boim, M.A. (2003). HSP70 induced by hyperosmotic stress partially protects LLC-PK1 cells against nephrotoxic drugs. *Nephron Exp Nephrol* 94, e94-102.

Lemaire, C., Andreau, K., Souvannavong, V., y Adam, A. (1998). Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis. *FEBS Lett* 425, 266-270.

Lemasters, J.J. (2005). Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 129, 351-360.

Lemasters, J.J., Qian, T., Bradham, C.A., Brenner, D.A., Cascio, W.E., Trost, L.C., Nishimura, Y., Nieminen, A.L., y Herman, B. (1999). Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr* 31, 305-319.

Lesage, S., Steff, A.M., Philippoussis, F., Page, M., Trop, S., Mateo, V., y Hugo, P. (1997). CD4⁺ CD8⁺ thymocytes are preferentially induced to die following CD45 cross-linking, through a novel apoptotic pathway. *J Immunol* 159, 4762-4771.

Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., y Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 183-192.

Li, C.Y., Lee, J.S., Ko, Y.G., Kim, J.I., y Seo, J.S. (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* 275, 25665-25671.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., y Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Li, L., Lorenzo, P.S., Bogi, K., Blumberg, P.M., y Yuspa, S.H. (1999a). Protein kinase Cdelta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector. *Mol Cell Biol* 19, 8547-8558.

Li, P.F., Dietz, R., y von Harsdorf, R. (1999b). Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Lett* 448, 206-210.

Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J., y Han, J. (1996). The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 334-340.

Liang, H., y Fesik, S.W. (1997). Three-dimensional structures of proteins involved in programmed cell death. *J Mol Biol* 274, 291-302.

Lieberthal, W., y Levine, J.S. (1996). Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 271, F477-488.

Lieberthal, W., Menza, S.A., y Levine, J.S. (1998). Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am J Physiol* 274, F315-327.

Lieberthal, W., Triaca, V., y Levine, J. (1996). Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol* 270, F700-708.

Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G.L., y Karin, M. (1995). Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* 268, 286-290.

Liu, Q., Hilsenbeck, S., y Gazitt, Y. (2003). Arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloma cells: p53-dependent G1 or G2/M cell cycle arrest, activation of caspase-8 or caspase-9, and synergy with APO2/TRAIL. *Blood* 101, 4078-4087.

Ljungman, M., Zhang, F., Chen, F., Rainbow, A.J., y McKay, B.C. (1999). Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. *Oncogene* 18, 583-592.

Lockshin, R., y Williams, C. (1964). Programmed cell death-II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol.* 10, 643-649.

Ludwig, T., Riethmuller, C., Gekle, M., Schwerdt, G., y Oberleithner, H. (2004). Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. *Kidney Int* 66, 196-202.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., y Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

Maeno, E., Ishizaki, Y., Kanaseki, T., Hazama, A., y Okada, Y. (2000). Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9487-9492.

Majno, G., y Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.

Majumder, P.K., Pandey, P., Sun, X., Cheng, K., Datta, R., Saxena, S., Kharbanda, S., y Kufe, D. (2000). Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 275, 21793-21796.

Mandic, A., Viktorsson, K., Molin, M., Akusjarvi, G., Eguchi, H., Hayashi, S.I., Toi, M., Hansson, J., Linder, S., y Shoshan, M.C. (2001). Cisplatin induces the proapoptotic conformation of Bak in a deltaMEKK1-dependent manner. *Mol Cell Biol* 21, 3684-3691.

Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., y Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.

Mansouri, A., Ridgway, L.D., Korapati, A.L., Zhang, Q., Tian, L., Wang, Y., Siddik, Z.H., Mills, G.B., y Claret, F.X. (2003). Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 278, 19245-19256.

Marzo, I., Susin, S.A., Petit, P.X., Ravagnan, L., Brenner, C., Larochette, N., Zamzami, N., y Kroemer, G. (1998). Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. *FEBS Lett* 427, 198-202.

Mayor, F., Jr., Jurado-Pueyo, M., Campos, P.M., y Murga, C. (2007). Interfering with MAP kinase docking interactions: implications and perspective for the p38 route. *Cell Cycle* 6, 528-533.

McDonnell, T.J., y Korsmeyer, S.J. (1991). Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 349, 254-256.

Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., y Peter, M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 16, 2794-2804.

Mehlen, P., Briolay, J., Smith, L., Diaz-latoud, C., Fabre, N., Pauli, D., y Arrigo, A.P. (1993). Analysis of the resistance to heat and hydrogen peroxide stresses in COS cells transiently expressing wild type or deletion mutants of the Drosophila 27-kDa heat-shock protein. *Eur J Biochem* 215, 277-284.

Miguel, B.G., Rodriguez, M.E., Aller, P., Martinez, A.M., y Mata, F. (2005). Regulation of cadmium-induced apoptosis by PKCdelta in U937 human promonocytic cells. *Biochim Biophys Acta* 1743, 215-222.

Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M., y Thompson, C.B. (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385, 353-357.

Miossec, C., Dutilleul, V., Fassy, F., y Diu-Hercend, A. (1997). Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *J Biol Chem* 272, 13459-13462.

Mishima, K., Baba, A., Matsuo, M., Itoh, Y., y Oishi, R. (2006). Protective effect of cyclic AMP against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Free Radic Biol Med* 40, 1564-1577.

Mittelstadt, P.R., Salvador, J.M., Fornace, A.J., Jr., y Ashwell, J.D. (2005). Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell Cycle* 4, 1189-1192.

Mlejnek, P., y Prochazka, S. (2002). Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* 215, 158-166.

Molnar, A., Theodoras, A.M., Zon, L.I., y Kyriakis, J.M. (1997). Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. *J Biol Chem* 272, 13229-13235.

Montine, T.J., y Borch, R.F. (1990). Role of endogenous sulfur-containing nucleophiles in an in vitro model of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 39, 1751-1757.

Moriguchi, T., Toyoshima, F., Masuyama, N., Hanafusa, H., Gotoh, Y., y Nishida, E. (1997). A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNF α and cellular stresses. *Embo J* 16, 7045-7053.

Morrison, D.K., y Davis, R.J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 91-118.

Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L., y Fesik, S.W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341.

Nebreda, A.R., y Porras, A. (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* 25, 257-260.

Nemoto, S., Xiang, J., Huang, S., y Lin, A. (1998). Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38 β mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273, 16415-16420.

New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L.J., Kato, Y., Parry, G.C., y Han, J. (1998). PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *Embo J* 17, 3372-3384.

New, L., Zhao, M., Li, Y., Bassett, W.W., Feng, Y., Ludwig, S., Padova, F.D., Gram, H., y Han, J. (1999). Cloning and characterization of RLPK, a novel RSK-related protein kinase. *J Biol Chem* 274, 1026-1032.

Nouwen, E.J., Verstrepen, W.A., Buysens, N., Zhu, M.Q., y De Broe, M.E. (1994). Hyperplasia, hypertrophy, and phenotypic alterations in the distal nephron after acute proximal tubular injury in the rat. *Lab Invest* 70, 479-493.

Nutt, L.K., Gogvadze, V., Uthaisang, W., Mirnikjoo, B., McConkey, D.J., y Orrenius, S. (2005). Indirect effects of Bax and Bak initiate the mitochondrial alterations that lead to cytochrome c release during arsenic trioxide-induced apoptosis. *Cancer Biol Ther* 4, 459-467.

O'Brien, P., y Salacinski, H.J. (1998). Evidence that the reactions of cadmium in the presence of metallothionein can produce hydroxyl radicals. *Arch Toxicol* 72, 690-700.

O'Dwyer, P.J., Stevenson, J.P., y Johnson, S.W. (2000). Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs* 59 Suppl 4, 19-27.

Ohkusu-Tsukada, K., Tominaga, N., Udono, H., y Yui, K. (2004). Regulation of the maintenance of peripheral T-cell anergy by TAB1-mediated p38 alpha activation. *Mol Cell Biol* 24, 6957-6966.

Oltvai, Z.N., y Korsmeyer, S.J. (1994). Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 79, 189-192.

Ono, K., y Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12, 1-13.

Ortiz, A., Cuadrado, S.G., Lorz, C., y Egido, J. (1996). Apoptosis in renal diseases. *Front Biosci* 1, d30-47.

Ortiz, A., Lorz, C., Catalan, M.P., Danoff, T.M., Yamasaki, Y., Egido, J., y Neilson, E.G. (2000). Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure. *Kidney Int* 57, 969-981.

Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., y Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1259-1263.

Park, M.S., De Leon, M., y Devarajan, P. (2002). Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol* 13, 858-865.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., y Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.

Peraza, M.A., Crome, D.W., Carolus, B., Carter, D.E., y Gandolfi, A.J. (2006). Morphological and functional alterations in human proximal tubular cell line induced by low level inorganic arsenic: evidence for targeting of mitochondria and initiated apoptosis. *J Appl Toxicol* 26, 356-367.

Perez, D., y White, E. (2000). TNF-alpha signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in Bax that is inhibited by E1B 19K. *Mol Cell* 6, 53-63.

Perez, R.P. (1998). Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer* 34, 1535-1542.

Perfettini, J.L., Castedo, M., Nardacci, R., Ciccocanti, F., Boya, P., Roumier, T., Larochette, N., Piacentini, M., y Kroemer, G. (2005). Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *J Exp Med* 201, 279-289.

Petit, P.X., O'Connor, J.E., Grunwald, D., y Brown, S.C. (1990). Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications. *Eur J Biochem* 194, 389-397.

Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Pistolese, M., y Paradies, G. (2001). Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS Lett* 509, 435-438.

Pierce, G.B., Parchment, R.E., y Lewellyn, A.L. (1991). Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation* 46, 181-186.

Pierrat, B., Correia, J.S., Mary, J.L., Tomas-Zuber, M., y Lesslauer, W. (1998). RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38alpha mitogen-activated protein kinase (p38alphaMAPK). *J Biol Chem* 273, 29661-29671.

Pinto, A.L., y Lippard, S.J. (1985). Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochim Biophys Acta* 780, 167-180.

Prestayko, A.W., D'Aoust, J.C., Issell, B.F., y Crooke, S.T. (1979). Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat Rev* 6, 17-39.

Prozialeck, W.C., y Lamar, P.C. (1995). Effects of glutathione depletion on the cytotoxic actions of cadmium in LLC-PK1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 134, 285-295.

Qian, Y., Castranova, V., y Shi, X. (2003). New perspectives in arsenic-induced cell signal transduction. *J Inorg Biochem* 96, 271-278.

Quiroga, A.G., Cubo, L., de Blas, E., Aller, P., y Navarro-Ranninger, C. (2007). Trans platinum complexes design: one novel water soluble oxime derivative that contains aliphatic amines in trans configuration. *J Inorg Biochem* 101, 104-110.

Quiroga, A.G., Perez, J.M., Alonso, C., Navarro-Ranninger, C., y Farrell, N. (2006). Novel transplatinum(II) complexes with [N₂O₂] donor sets. Cellular pharmacology and apoptosis induction in Pam 212-ras cells. *J Med Chem* 49, 224-231.

Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., y Davis, R.J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270, 7420-7426.

Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B., y Davis, R.J. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 16, 1247-1255.

Ramesh, G., y Brian Reeves, W. (2006). Cisplatin increases TNF-alpha mRNA stability in kidney proximal tubule cells. *Ren Fail* 28, 583-592.

Ramesh, G., y Reeves, W.B. (2005). p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F166-174.

Ramirez-Camacho, R., Citores, M.J., Trinidad, A., Verdaguer, J.M., Garcia-Berrocal, J.R., Marero, A.M., Puente, A., Gonzalez-Garcia, J.A., y Vargas, J.A. (2007). HSP-70 as a nonspecific early marker in cisplatin ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 127, 564-567.

Rathmell, J.C., y Thompson, C.B. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109 Suppl, S97-107.

Reed, D.J. (1990). Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30, 603-631.

Robertson, J.D., y Orrenius, S. (2000). Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol* 30, 609-627.

Robertson, J.D., Orrenius, S., y Zhivotovsky, B. (2000). Review: nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol* 129, 346-358.

Roos, N., Benz, R., y Brdiczka, D. (1982). Identification and characterization of the pore-forming protein in the outer membrane of rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 686, 204-214.

Rosenberg, B., Vancamp, L., y Krigas, T. (1965). Inhibition Of Cell Division In Escherichia Coli By Electrolysis Products From A Platinum Electrode. *Nature* 205, 698-699.

Rosenberg, J.M., y Sato, P.H. (1993). Cisplatin inhibits in vitro translation by preventing the formation of complete initiation complex. *Mol Pharmacol* 43, 491-497.

Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Topalian, S.L., Seipp, C.A., Einhorn, J.H., White, D.E., y Steinberg, S.M. (1999). Prospective randomized trial of the treatment of patients with metastatic melanoma using chemotherapy with cisplatin, dacarbazine, and tamoxifen alone or in combination with interleukin-2 and interferon alfa-2b. *J Clin Oncol* 17, 968-975.

Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., y Nebreda, A.R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027-1037.

Ruffolo, S.C., y Shore, G.C. (2003). BCL-2 selectively interacts with the BID-induced open conformer of BAK, inhibiting BAK auto-oligomerization. *J Biol Chem* 278, 25039-25045.

Ryan, M.J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S.M., Zager, R.A., y Torok-Storb, B. (1994). HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int* 45, 48-57.

Salahudeen, A., Poovala, V., Parry, W., Pande, R., Kanji, V., Ansari, N., Morrow, J., y Roberts, J., 2nd (1998). Cisplatin induces N-acetyl cysteine suppressible F2-isoprostane production and injury in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 9, 1448-1455.

Salvesen, G.S., y Abrams, J.M. (2004). Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene* 23, 2774-2784.

Salvesen, G.S., y Dixit, V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-10967.

Sanchez-Prieto, R., Rojas, J.M., Taya, Y., y Gutkind, J.S. (2000). A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 60, 2464-2472.

Sanchez-Prieto, R., Sanchez-Arevalo, V.J., Servitja, J.M., y Gutkind, J.S. (2002). Regulation of p73 by c-Abl through the p38 MAP kinase pathway. *Oncogene* 21, 974-979.

Satarug, S., Haswell-Elkins, M.R., y Moore, M.R. (2000). Safe levels of cadmium intake to prevent renal toxicity in human subjects. *Br J Nutr* 84, 791-802.

Sato, N., Iwata, S., Nakamura, K., Hori, T., Mori, K., y Yodoi, J. (1995). Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. Possible roles of cellular thiols other than glutathione in T cell apoptosis. *J Immunol* 154, 3194-3203.

Schedl, P., Artavanis-Tsakonas, S., Steward, R., Gehring, W.J., Mirault, M.E., Goldschmidt-Clermont, M., Moran, L., y Tissieres, A. (1978). Two hybrid plasmids with *D. melanogaster* DNA sequences complementary to mRNA coding for the major heat shock protein. *Cell* 14, 921-929.

Schoorlemmer, J., y Goldfarb, M. (2001). Fibroblast growth factor homologous factors are intracellular signaling proteins. *Curr Biol* 11, 793-797.

Schoorlemmer, J., y Goldfarb, M. (2002). Fibroblast growth factor homologous factors and the islet brain-2 scaffold protein regulate activation of a stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277, 49111-49119.

Schreck, R., Rieber, P., y Baeuerle, P.A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* 10, 2247-2258.

Schumer, M., Colombel, M.C., Sawczuk, I.S., Gobe, G., Connor, J., O'Toole, K.M., Olsson, C.A., Wise, G.J., y Buttyan, R. (1992). Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol* 140, 831-838.

Shaikh, Z.A., Vu, T.T., y Zaman, K. (1999). Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 154, 256-263.

Sheridan, A.M., y Bonventre, J.V. (2000). Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9, 427-434.

Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9, 459-470.

Shi, Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* 13, 1979-1987.

Shi, Z., Resing, K.A., y Ahn, N.G. (2006). Networks for the allosteric control of protein kinases. *Curr Opin Struct Biol* 16, 686-692.

Shimada, M., Takenaka, K., Taguchi, K., Fujiwara, Y., Gion, T., Kajiyama, K., Maeda, T., Shirabe, K., Yanaga, K., y Sugimachi, K. (1998). Prognostic factors after repeat hepatectomy for recurrent hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 227, 80-85.

Shimizu, A., y Yamanaka, N. (1993). Apoptosis and cell desquamation in repair process of ischemic tubular necrosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 64, 171-180.

Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T., y Tsujimoto, Y. (2000a). Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem* 275, 12321-12325.

Shimizu, S., Narita, M., y Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-487.

Shimizu, S., Shinohara, Y., y Tsujimoto, Y. (2000b). Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19, 4309-4318.

Shimizu, S., y Tsujimoto, Y. (2000). Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 577-582.

Shou, Y., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J.L., y Isom, G.E. (2003). p38 Mitogen-activated protein kinase regulates Bax translocation in cyanide-induced apoptosis. *Toxicol Sci* 75, 99-107.

Siddik, Z.H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265-7279.

Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91, 31S-38S.

Siskind, L.J. (2005). Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 37, 143-153.

Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Zohar, M., Bais, C., Mesri, E.A., y Gutkind, J.S. (2000). The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res* 60, 4873-4880.

Soignet, S.L., Maslak, P., Wang, Z.G., Jhanwar, S., Calleja, E., Dardashti, L.J., Corso, D., DeBlasio, A., Gabrilove, J., Scheinberg, D.A., Pandolfi, P.P., y Warrell, R.P., Jr. (1998). Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med* 339, 1341-1348.

Speelmans, G., Staffhorst, R.W., Versluis, K., Reedijk, J., y de Kruijff, B. (1997). Cisplatin complexes with phosphatidylserine in membranes. *Biochemistry* 36, 10545-10550.

Springs, S.L., Diavolitis, V.M., Goodhouse, J., y McLendon, G.L. (2002). The kinetics of translocation of Smac/DIABLO from the mitochondria to the cytosol in HeLa cells. *J Biol Chem* 277, 45715-45718.

Stinson, L.J., Darmon, A.J., Dagnino, L., y D'Souza, S.J. (2003). Delayed apoptosis post-cadmium injury in renal proximal tubule epithelial cells. *Am J Nephrol* 23, 27-37.

Stohs, S.J., y Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18, 321-336.

Sugihara, K., Nakano, S., Koda, M., Tanaka, K., Fukuishi, N., y Gemba, M. (1987). Stimulatory effect of cisplatin on production of lipid peroxidation in renal tissues. *Jpn J Pharmacol* 43, 247-252.

Sundstrom, C., y Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17, 565-577.

Suwalsky, M., Hernandez, P., Villena, F., y Sotomayor, C.P. (2000). The anticancer drug cisplatin interacts with the human erythrocyte membrane. *Z Naturforsch [C]* 55, 461-466.

Sweet, D.H., Miller, D.S., y Pritchard, J.B. (2000). Basolateral localization of organic cation transporter 2 in intact renal proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F826-834.

Syntichaki, P., y Tavernarakis, N. (2002). Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Rep* 3, 604-609.

Szuster-Ciesielska, A., Stachura, A., Slotwinska, M., Kaminska, T., Snieszko, R., Paduch, R., Abramczyk, D., Filar, J., y Kandefer-Szerszen, M. (2000). The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* 145, 159-171.

Takekawa, M., Maeda, T., y Saito, H. (1998). Protein phosphatase 2 α inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *Embo J* 17, 4744-4752.

Tamura, S., Hanada, M., Ohnishi, M., Katsura, K., Sasaki, M., y Kobayashi, T. (2002). Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. *Eur J Biochem* 269, 1060-1066.

Tanno, M., Bassi, R., Gorog, D.A., Saurin, A.T., Jiang, J., Heads, R.J., Martin, J.L., Davis, R.J., Flavell, R.A., y Marber, M.S. (2003). Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for MKK-independent

activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. *Circ Res* 93, 254-261.

Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M., y Nishida, E. (2001). Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *Embo J* 20, 466-479.

Tanveer, A., Virji, S., Andreeva, L., Totty, N.F., Hsuan, J.J., Ward, J.M., y Crompton, M. (1996). Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. *Eur J Biochem* 238, 166-172.

Thanislass, J., Raveendran, M., Sivasithamparam, N., y Devaraj, H. (1996). Effect of chronic glutathione deficiency on rat lung mitochondrial function. *Pulm Pharmacol* 9, 119-122.

Thannickal, V.J., y Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1005-1028.

Thevenod, F., Friedmann, J.M., Katsen, A.D., y Hauser, I.A. (2000). Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275, 1887-1896.

Thomas, E.L., Lehrer, R.I., y Rest, R.F. (1988). Human neutrophil antimicrobial activity. *Rev Infect Dis* 10 Suppl 2, S450-456.

Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Tian, W., Zhang, Z., y Cohen, D.M. (2000). MAPK signaling and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F593-604.

Tornero, D., Cena, V., Gonzalez- Garcia, C., y Jordan, J. (2002). [The role of the mitochondrial permeability transition pore in neurodegenerative processes]. *Rev Neurol* 35, 354-361.

Troyano, A., Fernandez, C., Sancho, P., de Blas, E., y Aller, P. (2001). Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. The role of intracellular oxidation. *J Biol Chem* 276, 47107-47115.

Tsuruya, K., Tokumoto, M., Ninomiya, T., Hirakawa, M., Masutani, K., Taniguchi, M., Fukuda, K., Kanai, H., Hirakata, H., y Iida, M. (2003). Antioxidant ameliorates cisplatin-

induced renal tubular cell death through inhibition of death receptor-mediated pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 285, F208-218.

Urakami, Y., Okuda, M., Masuda, S., Akazawa, M., Saito, H., y Inui, K. (2001). Distinct characteristics of organic cation transporters, OCT1 and OCT2, in the basolateral membrane of renal tubules. *Pharm Res* 18, 1528-1534.

Valko, M., Morris, H., y Cronin, M.T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12, 1161-1208.

Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T., y Thompson, C.B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91, 627-637.

Vaux, D.L., Cory, S., y Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442.

Vaux, D.L., y Korsmeyer, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.

Vergne, P., Delvallee, I., y Dumas, C. (1987). Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permeabilization. *Stain Technol* 62, 299-304.

Verheij, M., Ruiter, G.A., Zerp, S.F., van Blitterswijk, W.J., Fuks, Z., Haimovitz-Friedman, A., y Bartelink, H. (1998). The role of the stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) signaling pathway in radiation-induced apoptosis. *Radiother Oncol* 47, 225-232.

Vogt, C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte *Alytes obstetricans*. Grassmann [parte de la biblioteca de Müller], Solothurn.

von Ahsen, O., Renken, C., Perkins, G., Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., y Newmeyer, D.D. (2000a). Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* 150, 1027-1036.

von Ahsen, O., Waterhouse, N.J., Kuwana, T., Newmeyer, D.D., y Green, D.R. (2000b). The 'harmless' release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7, 1192-1199.

Wakui, H., Komatsuda, A., y Miura, A.B. (1995). Heat-shock proteins in animal models for acute renal failure. *Ren Fail* 17, 641-649.

Wang, X., McGowan, C.H., Zhao, M., He, L., Downey, J.S., Fearn, C., Wang, Y., Huang, S., y Han, J. (2000). Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 20, 4543-4552.

Wang, Y., Huang, S., Sah, V.P., Ross, J., Jr., Brown, J.H., Han, J., y Chien, K.R. (1998). Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 273, 2161-2168.

Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., y Cooper, J.A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J* 16, 1909-1920.

Watanabe, H., de Caestecker, M.P., y Yamada, Y. (2001). Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells. *J Biol Chem* 276, 14466-14473.

Welch, W.J. (1985). Phorbol ester, calcium ionophore, or serum added to quiescent rat embryo fibroblast cells all result in the elevated phosphorylation of two 28,000-dalton mammalian stress proteins. *J Biol Chem* 260, 3058-3062.

Welch, W.J. (1991). The role of heat-shock proteins as molecular chaperones. *Curr Opin Cell Biol* 3, 1033-1038.

Wilson, K.P., McCaffrey, P.G., Hsiao, K., Pazhanisamy, S., Galullo, V., Bemis, G.W., Fitzgibbon, M.J., Caron, P.R., Murcko, M.A., y Su, M.S. (1997). The structural basis for the specificity of pyridinylimidazole inhibitors of p38 MAP kinase. *Chem Biol* 4, 423-431.

Wyllie, A.H. (1987). Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol* 153, 313-316.

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., y Greenberg, M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.

Xie, J., y Shaikh, Z.A. (2006). Cadmium induces cell cycle arrest in rat kidney epithelial cells in G2/M phase. *Toxicology* 224, 56-65.

Yamamoto, K., Okamoto, A., Isonishi, S., Ochiai, K., y Ohtake, Y. (2001). Heat shock protein 27 was up-regulated in cisplatin resistant human ovarian tumor cell line and associated with the cisplatin resistance. *Cancer Lett* 168, 173-181.

Yang, C., y Frenkel, K. (2002). Arsenic-mediated cellular signal transduction, transcription factor activation, and aberrant gene expression: implications in carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 21, 331-342.

Yano, T., Itoh, Y., Matsuo, M., Kawashiri, T., Egashira, N., y Oishi, R. (2007). Involvement of both tumor necrosis factor-alpha-induced necrosis and p53-mediated caspase-dependent apoptosis in nephrotoxicity of cisplatin. *Apoptosis* 12, 1901-1909.

Yee, A.S., Paulson, E.K., McDevitt, M.A., Rieger-Christ, K., Summerhayes, I., Berasi, S.P., Kim, J., Huang, C.Y., y Zhang, X. (2004). The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. *Gene* 336, 1-13.

Young, P.R., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M.L., McNulty, D., Gallagher, T.F., Fisher, S., McDonnell, P.C., Carr, S.A., Huddleston, M.J., Seibel, G., Porter, T.G., Livi, G.P., Adams, J.L., y Lee, J.C. (1997). Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem* 272, 12116-12121.

Zarubin, T., y Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15, 11-18.

Zhan, Y., van de Water, B., Wang, Y., y Stevens, J.L. (1999). The roles of caspase-3 and bcl-2 in chemically-induced apoptosis but not necrosis of renal epithelial cells. *Oncogene* 18, 6505-6512.

Zhang, K., Chew, M., Yang, E.B., Wong, K.P., y Mack, P. (2001). Modulation of cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA cross-links in HepG2 cells by regulation of glutathione-related mechanisms. *Mol Pharmacol* 59, 837-843.

Zheng, L., Roeder, R.G., y Luo, Y. (2003). S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* 114, 255-266.

Ziegler-Heitbrock, H.W., Blumenstein, M., Kafferlein, E., Kieper, D., Petersmann, I., Endres, S., Flegel, W.A., Northoff, H., Riethmuller, G., y Haas, J.G. (1992). In vitro desensitization to lipopolysaccharide suppresses tumour necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in a similar fashion. *Immunology* 75, 264-268.

Zimmerhackl, L.B., Momm, F., Wiegele, G., y Brandis, M. (1998). Cadmium is more toxic to LLC-PK1 cells than to MDCK cells acting on the cadherin-catenin complex. *Am J Physiol* 275, F143-153.

Zoratti, M., y Szabo, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241, 139-176.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., y Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556.

Zunino, F., Pratesi, G., Micheloni, A., Cavalletti, E., Sala, F., y Tofanetti, O. (1989). Protective effect of reduced glutathione against cisplatin-induced renal and systemic

toxicity and its influence on the therapeutic activity of the antitumor drug. *Chem Biol Interact* 70, 89-101.